

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

Biotransformación de selenio en procesos de fermentación y desarrollo de alimentos enriquecidos en selenio, estudios de biodisponibilidad con ensayos *in vivo*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María José Sánchez Martínez

Directoras

Yolanda Madrid Albarrán
María Teresa Pérez Corona

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**BIOTRANSFORMACIÓN DE SELENIO EN PROCESOS DE
FERMENTACIÓN Y DESARROLLO DE ALIMENTOS
ENRIQUECIDOS EN SELENIO. ESTUDIOS DE
BIODISPONIBILIDAD CON ENSAYOS *IN VIVO***

Directoras:

Dra. Yolanda Madrid Albarrán

Dra. María Teresa Pérez Corona

María José Sánchez Martínez

Madrid, 2014

Dra. YOLANDA MADRID ALBARRÁN, PROFESORA TITULAR DEL
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, y

Dra. MARÍA TERESA PÉREZ CORONA, PROFESORA CONTRATADO DOCTOR DEL
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

HACEN CONSTAR QUE:

El presente trabajo titulado “**Biotransformación de selenio en procesos de fermentación y desarrollo de alimentos enriquecidos en selenio. Estudios de biodisponibilidad con ensayos *in vivo***” ha sido realizado por la Licenciada Dña. María José Sánchez Martínez en este Departamento, y bajo su supervisión, constituyendo la Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, 16 de Septiembre de 2014

Fdo.: Yolanda Madrid Albarrán

Fdo.: María Teresa Pérez Corona

ÍNDICE

I. SUMMARY	1
II. INTRODUCCIÓN	11
II. CAPÍTULO 1. SELENIO: IMPORTANCIA Y ESENCIALIDAD	13
II.1.1. RELEVANCIA BIOLÓGICA DEL SELENIO Y SUS ESPECIES.....	13
II.1.1.1. ESENCIALIDAD Y METABOLISMO DEL SELENIO: SELENOPROTEÍNAS.....	13
II.1.1.2. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE SELENIO.....	24
II.1.1.3. TOXICIDAD DEL SELENIO.....	26
II.1.1.4. EFECTO PROTECTOR DEL SELENIO FRENTE A ENFERMEDADES	28
II. CAPÍTULO 2. EL SELENIO EN LOS ALIMENTOS	33
II.2.1. FUENTES DE SELENIO EN LA DIETA Y BIODISPONIBILIDAD.....	33
II.2.2. DESARROLLO DE ALIMENTOS ENRIQUECIDOS EN SELENIO	37
II.2.2.1. BIOTRANSFORMACIÓN DE SELENIO POR PARTE DE	
MICROORGANISMOS: LEVADURAS Y BACTERIAS LÁCTICAS.....	40
II.2.2.2. ELABORACIÓN DE ALIMENTOS MEDIANTE	
PROCESOS DE FERMENTACIÓN	42
II.2.2.3. BIOFORTIFICACIÓN DE CULTIVOS	49
II. CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN	
DE SELENIO Y SUS ESPECIES EN MUESTRAS BIOLÓGICAS	
Y ALIMENTOS.....	51
II.3.1. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.....	51
II.3.1.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE SELENIO.....	53
II.3.1.2. EXTRACCIÓN DE ESPECIES DE SELENIO	54
II.3.2. DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO POR CROMATOGRAFIA	
LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA ACOPLADA A LA ESPECTROMETRIA DE MASAS	
CON PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO (HPLC-ICP-MS).....	58

II.3.3. ANÁLISIS POR DILUCIÓN ISOTÓPICA	64
II.3.3.1. FUNDAMENTO Y VENTAJAS DE LA DILUCIÓN ISOTÓPICA	64
II.3.3.2. ESPECIACIÓN CUANTITATIVA DE SELENIO MEDIANTE DILUCIÓN ISOTÓPICA-ICP-MS	69
III. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
IV. OBJETIVOS	99
V. PARTE EXPERIMENTAL	107
V. CAPÍTULO 1. ESTUDIOS DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DE SELENIO EN LA ELABORACIÓN DE ALIMENTOS OBTENIDOS POR FERMENTACIÓN POR ACCIÓN DE LEVADURA SACCHAROMYCES	109
V.1.1. BIOTRANSFORMACIÓN DE SELENIO MEDIANTE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> Y <i>SACCHAROMYCES BAYANUS</i> DURANTE LA PRODUCCIÓN DE VINO BLANCO: EXPERIMENTOS A ESCALA DE LABORATORIO.....	117
V.1.2. BIOTRANSFORMACIÓN DE SELENITO DURANTE LA ELABORACIÓN DE LA CERVEZA. EVALUACIÓN POR HPLC-ICP-MS	125
V.1.3. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PAN ENRIQUECIDO EN SELENOMETIONINA A ESCALA DE LABORATORIO. BIOACCESIBILIDAD DEL SELENIO	133
V. CAPÍTULO 2. EVALUACIÓN DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DE SELENIO EN ALIMENTOS FERMENTADOS MEDIANTE LA BACTERIA LACTOBACILLUS	171
V.2.1. EL SELENIO AUMENTA EL CONTENIDO DE LOS INDOLES PRODUCIDOS POR HIDRÓLISIS DE GLUCOSINOLATOS, LA CONCENTRACIÓN DE SELENOMETILSELENOCISTEÍNA, LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIA DEL CHUCRUT	175

V. CAPÍTULO 3. ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL SELENIO EN RATAS ALIMENTADAS CON PRODUCTOS ENRIQUECIDOS EN SELENIO..... 185

V.3.1. SÍNTESIS DE ⁷⁷ SELENOMETILSELENOCISTEÍNA DURANTE LA PREPARACIÓN DE CHUCRUT EN PRESENCIA DE ⁷⁷ SELENITO. DETERMINACIÓN DEL METABOLISMO DE ⁷⁷ SELENOMETILSELENOCISTEÍNA EN RATAS WISTAR POR LC-ID-ICP-MS.....	187
---	-----

VI. DISCUSIÓN INTEGRADORA 225

VII. CONCLUSIONES 253

**VIII. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN RELACIONADOS
CON LA TESIS 259**

VIII.1. MIGRACIÓN DE ANTIMONIO DESDE ENVASES DE PET A SIMULANTES ALIMENTARIOS REGULADOS POR LA UNIÓN EUROPEA	263
---	-----

IX. GLOSARIO DE TÉRMINOS..... 273

I. SUMMARY

1.1. INTRODUCTION

Selenium (Se) is an essential element for human health. The health-promoting properties of Se are due to vital functions of selenoproteins in which selenium is present as selenocysteine (SeCys). Many recent studies have indicated that Se plays an important role in the immune system. It reduces the presence of free radicals, produced from oxygen metabolism, which may contribute to the development of chronic diseases such as cancer and heart diseases. The important role of selenoproteins in human metabolism justifies the adverse consequence of selenium deficiency. There are several parts of the world where selenium content in the diet has been estimated insufficient to reach correct activity of selenoproteins. For all commented above, the production of Se-enriched food and nutritional supplements is getting interest in the last years. It has been observed that some microorganisms are able to incorporate and biotransform inorganic selenium into organic Se-compounds which are considered nutritional safer and more bioactive than inorganic Se. This is the case of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and *Lactobacillus* bacteria, which are commonly used to prepare fermented food products. Therefore, they are suitable to prepare Se-enriched fermented food.

With the aim of identifying and quantifying Se-species in biological matrices and foodstuffs, hyphenated techniques based on the coupling of a chromatographic mechanism to a sensitive detector, are normally used. High performance liquid chromatography (HPLC) coupled “on-line” to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) is the technique most widely applied to Se speciation. In addition, isotope dilution analysis (IDA) combined with HPLC-ICP-MS, is considered an essential analytical tool to perform quantitative speciation analysis, allowing precise quantification, correction of species interconversion and species quantification when the standards are not available or the molecular structure of the Se-compound is unknown.

I.2. OBJECTIVES

The main goals of this thesis entitled: **“Biotransformation of selenium in fermentation process and development of selenium-enriched food. Bioavailability studies by means of *in vivo* assays”** are the following:

1. Development and/or characterization of Se-enriched food products based on fermentation procedures. The strategy used is based on the capability of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic bacteria to transform inorganic selenium into organic Se-compound. Several Se-enriched food products will be developed: wine, beer, bread and fermented-cabbage (sauerkraut).
2. Evaluation of Se bioaccessibility by means of an *in vitro* gastrointestinal digestion method.
3. Evaluation of Se metabolisms in Wistar rats by using stable Se-enriched isotopes as tracers.
4. Development of analytical procedures based on the use of ICP-MS and related techniques, which would allow us to achieve a complete study of total Se (ICP-MS), biotransformation (HPLC-ICP-MS), and quantification (IDA-ICP-MS) of Se-species.

I.3. RESULTS AND DISCUSSION

The work presented in this thesis has several purposes: on one hand, **the development and/or characterization of Se enriched food products based on fermentation procedures** and, by the other hand, the **study of selenium metabolism in living organisms** by using selenium stable isotopes as tracers. A brief discussion of the results obtained is given below.

I.3.1. Se-enriched fermented beverages (wine and beer) were prepared with different species of *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. uvarum*), by adding 0.2-20 mg Se/L as selenite. It was observed that yeast growth was unaltered by the presence of selenium in the culture medium and Se biotransformation was not influence by the type of *Saccharomyces* used. Se accumulation in the fermented beverages increases as the Se concentration increases with a maximum accumulation value of 60% of the selenite added. Se-species were determined by

HPLC-ICP-MS after enzymatic hydrolysis with and without protease, by using two methodologies: ultrasound probe sonication and incubation at controlled temperature. Results showed that SeMet was the main Se-species found in yeast, accounted for 95% of total Se present in yeast, and it was bound to proteins. In case of wine and beer, SeMet as well as SeMet oxide, were detected but in low amounts (1% of total Se found in the beverage), being both compounds non-bound to proteins. These results indicate that the origin of SeMet found in wine and beer is in the yeast, and the oxidation of SeMet is faster when it is not bound to proteins.

I.3.2. A widespread fermented food, **bread**, was also enriched with 1µg Se/g, as selenite, using white and wholemeal flour. Se enrichment of bread was performed by applying two different protocols: direct addition of Se to the dough; and using Se-yeast. Total Se content in the resulting products was determined by IDA-ICP-MS and Se-species were quantified in the mode post-column of HPLC-IDA-ICP-MS. Control bread rolls gave selenium concentration within 0.10-0.28 µg Se/g range. The presence of Se in the control products (without adding selenium) is due to the Se naturally present in the flour used for baking. Selenium content in Se-enriched bread accounted for 1.16-1.28 µg Se/g. SeMet was the main Se-species found in flour, bread, yeast and dough. Such species remains unaltered after applying the high temperatures required for baking. Se-species extraction was performed by enzymatic hydrolysis using three methodologies: microwave extraction, incubation in a bath at controlled temperature and ultrasonic probe sonication, being the later the most promising one. Regarding the way of performing selenium enrichment of bread, direct addition of Se to the dough did not provide total conversion of selenite since SeMet was accompanied by other low molecular weight Se-compounds. The best results, in terms of getting maximum SeMet content in Se-bread, were obtained when using Se-yeast for baking. Se-yeast was prepared in the laboratory by incubating yeast in presence of selenite during 96 hour. Under these experimental conditions selenite was quantitatively transformed into SeMet. Bioaccessibility studies were performed by *in vitro* gastrointestinal procedure. Results indicated that 80% and 40% of total Se present in white and wholemeal Se-enriched bread was bioaccessible, respectively. Moreover, SeMet remains

unaltered during gastrointestinal digestion procedure. Finally, a comparison of manual and mechanical mixing of ingredients showed the need of mixing them mechanically to get bread rolls with Se homogeneously distributed.

I.3.3. *Lactobacillus* bacteria were also used to prepare selenium enriched food products, such as **Se-enriched sauerkraut**. Selenized sauerkraut was obtained during lactic fermentation of white cabbage in presence of selenite within a concentration range of 1.5-8.0 µg Se/g. Results from ICP-MS analysis showed that Se is totally incorporated to sauerkraut, being mainly present as selenomethylselenocysteine (SeMeSeCys). Se-species extraction was performed by ultrasonic probe sonication with and without protease, obtaining similar species recoveries, which means that such species is not bound to proteins. The addition of Se increased antioxidant and antiinflammatory properties of sauerkraut, and also the content of some indole glucosinolate breakdown product considered an anticarcinogenic agent. The addition of other bacteria, *Leuconostoc mesenteroides*, to white cabbage before the fermentation procedure did not modified the yield of Se biotransformation. This work illustrates a simple and cheap method to prepare ⁷⁷SeMeSeCys as an alternative to the existing procedures to prepare isotopically enriched species.

I.3.4. Selenium stable isotopes were used as tracers to **study the metabolism of SeMeSeCys in rats**. For this purpose rats were fed with a diet containing 20% of ⁷⁷SeMeSeCys-sauerkraut. AIN diet presented low amounts of SeMet and Se(IV). The use of IDA-ICP-MS was applied to determine Se in organs of control rats (fed with AIN diet containing 20% of sauerkraut without Se), while reversed IDA was used for ⁷⁷Se-labelled organs analysis. Speciation studies were performed by using HPLC-IDA-ICP-MS by post-column mode. Selenium distribution in organs rats was strongly dependent on the tissue analyzed, being kidney and heart the organs more affected when adding Se-enriched sauerkraut to the diet. Moreover, selenium supplementation modifies the content of other minerals such as Cu, Zn, Mg, Mo, in those organs which experimented the highest increase after Se supplementation, that is, kidney and heart. By the other hand, the combination of enzymatic hydrolysis with carbamidomethylation (CAM)

process, allowed us to extract SeCys from both control and ^{77}Se -labelled organs, which means that Se ingested was mainly incorporated into selenoproteins. Also, another unknown Se-species, more abundant in ^{77}Se -labelled organs than in control ones, was extracted. Unfortunately, its identification by ESI-MS/MS was not possible. Post-column IDA was crucial to quantify both SeCys and the unknown Se-species found. Se-species recovery values were highly dependent on the tissue analyzed with recovery values ranged within 16-76%.

I.4. CONCLUSIONS

The main conclusions from this work can be summarized as follows:

- 1.** The capability of to *Saccharomyces* and *Lactobacillus* genus to transform inorganic selenium into organic selenium compounds has been successfully applied to prepare Se-enriched fermented food. Se biotransformation studies revealed differences depending on the microorganism used. *Saccharomyces cerevisiae* transforms selenite mainly into SeMet while *Lactobacillus plantarum* produces SeMeSeCys.
- 2.** The addition of Se-species improves the nutritional value of the resulting Se-enriched food products. SeMet in Se-white bread improves Se bioaccessibility, while SeMeSeCys enhances the antioxidant and antiinflammatory properties of sauerkraut.
- 3.** The use of isotopically labelled species is of special interest to monitor Se-species biotransformation in the organism and during food manufacturing.
- 4.** The development of an analytical methodology based on HPLC-IDA-ICP-MS was crucial to determine Se-species in a wide variety of matrices and therefore to characterize the resulting products and selenium metabolisms studies.

II. INTRODUCCIÓN

II. CAPÍTULO 1. SELENIO: IMPORTANCIA Y ESENCIALIDAD

II.1.1. RELEVANCIA BIOLÓGICA DEL SELENIO Y SUS ESPECIES

El selenio (Se) es un elemento traza esencial para los seres vivos, ya que presenta importantes propiedades antioxidantes, además de estar relacionado con las funciones inmune y tiroidea. Por otro lado, está involucrado en la prevención del cáncer, de enfermedades víricas, problemas cardiovasculares, de fertilidad, y presenta un efecto antagónico frente a elementos tóxicos como el mercurio, arsénico, cadmio o el plomo (Rayman, 2000). Desde que se descubriesen sus efectos beneficiosos en seres vivos en 1957 por Schwarz *et al.* (1957), numerosas investigaciones han evidenciado que las propiedades del selenio dependen no sólo de su concentración sino de la forma química en que se encuentra (Rayman, 2000).

II.1.1.1. ESENCIALIDAD Y METABOLISMO DEL SELENIO: SELENOPROTEÍNAS

Desde su descubrimiento en 1817 por Jöns Jacob Berzelius (Hurd *et al.*, 1964), el selenio ha pasado de ser un elemento tóxico a ser considerado esencial para los organismos vivos. No fue hasta 1957 cuando se evidenció su efecto beneficioso, al observarse su efecto protector frente a la necrosis hepática en ratas con deficiencia en vitamina E a las que se les había suministrado selenio (Schwarz *et al.*, 1957), lo cual despertó un gran interés en conocer sus propiedades. Posteriormente, en 1973, se identificó la primera selenoproteína, glutatión peroxidasa (GPx), la cual presentaba propiedades antioxidantes, demostrándose así su función biológica en animales (Rotruck *et al.*, 1973).

Una de las principales razones para considerar al selenio como un elemento esencial es su capacidad para sustituir fácilmente al azufre en biomoléculas, debido a la similitud química existente entre ambos elementos (Arnér, 2010). Así, el selenio puede incorporarse a las proteínas de manera específica en forma de selenocisteína (SeCys), formando las llamadas selenoproteínas, donde se sitúa en el centro activo de las mismas, hecho que demuestra su

importancia (López-Heras *et al.*, 2011; Rayman, 2012). Por otro lado, el selenio en forma de selenometionina (SeMet) puede emplearse en la síntesis de proteínas, incorporándose de manera inespecífica en lugar de la metionina (Met) (Suzuki, 2005), en las denominadas proteínas que contienen selenio. La elevada capacidad catalítica de las selenoproteínas en comparación con sus homólogas sulfuradas se ha atribuido a la extraordinaria nucleofilia del residuo SeCys, aunque no se sabe si podrían existir más factores que contribuyesen a ello (Arnér, 2010).

El número de selenoproteínas difiere de manera significativa entre organismos, desde las 3600 encontradas en organismos marinos hasta las 15 presentes en bacterias (Arnér, 2010). En la actualidad se han identificado 25 selenoproteínas en seres humanos, aunque la función de muchas de ellas no ha sido aún determinada (Rayman, 2012). Entre las selenoproteínas más relevantes se encuentran las de las familias glutatión peroxidasa (GPx), tioredoxina reductasa (TR), la yodotironina deiodinasa (ID) y la selenoproteína P (SeIP) (López-Heras *et al.*, 2011). A continuación se describen brevemente las funciones esenciales de las selenoproteínas mejor caracterizadas hasta el momento.

Glutatión Peroxidasa

Las glutatiónas peroxidadas (GPx) fueron las primeras selenoproteínas descubiertas por lo que son las mejor caracterizadas. Las selenoproteínas pertenecientes a esta familia tienen en común su función antioxidante, protegiendo a las células de especies reactivas de oxígeno (ROS), mediante la oxidación del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG). Así, mantienen unos niveles adecuadamente bajos de peróxido de hidrógeno en el interior de las células, reduciendo el estrés oxidativo (Abdulah *et al.*, 2005; Takebe *et al.*, 2002). No obstante, la estructura de cada una de ellas es diferente y además poseen funciones individuales. Las GPx mejor caracterizadas hasta el momento son:

La GPx1 (celular, clásica o citosólica), está presente en el citosol de todas las células, principalmente en el hígado, riñón y en los eritrocitos. Se cree que es la proteína antioxidante más abundante en mamíferos (Abdulah *et al.*, 2005; Chu *et al.*, 1993).

GPx2, también conocida como glutatión peroxidasa gastrointestinal debido a que su función biológica se expresa principalmente en el tracto gastrointestinal, se encarga de la protección contra hidroperóxidos lipídicos ingeridos (Chu *et al.*, 1993; Patching *et al.*, 1999; Tapiero *et al.*, 2003).

La GPx3 o plasmática es una glicoproteína extracelular que, tras la selenoproteína P, es la selenoproteína más abundante en el plasma sanguíneo (Beckett *et al.*, 2005; Burk *et al.*, 2003). Es uno de los biomarcadores mas empleados para determinar el estatus de selenio en individuos (Ballihaut *et al.*, 2011).

La GPx4 (fosfolípido peroxidasa) reduce específicamente los ácidos grasos hidroperóxidos a fosfolípidos (Tapiero *et al.*, 2003). Se encuentra en la cápsula mitocondrial de los espermatozoides y posee un importante papel en su formación, protegiéndolos de la oxidación y participando como componente estructural en la formación del flagelo, esencial para la motilidad del espermatozoide (Rayman, 2012).

Tiorredoxina Reductasa

La familia de las tiorredoxinas reductasas (TR) tiene como principal función proteger contra el estrés oxidativo (Abdulah *et al.*, 2005; Gallegos *et al.*, 1997), además de participar en la síntesis del ADN y estimular el crecimiento celular, tanto de células sanas como cancerígenas (Gallegos *et al.*, 1997). Pertenecen a ella las proteínas TR1, presente en el citosol y una de las más abundantes en mamíferos, la TR2 cuya expresión está limitada a los testículos, y la TR3, presente tanto fuera como dentro de la mitocondria (Tapiero *et al.*, 2003). Por otro lado, se cree que la TR humana posee otro codón (UAA) además del UGA, codón utilizado para la formación

de las selenoproteínas, que le permite seguir sintetizándose en estados carenciales de selenio sustituyendo la selenocisteína (SeCys) por cisteína (Cys). Sin embargo, no se sabe en qué medida esta modificación de la TR podría afectar a sus funciones dado que a pesar de no observarse una disminución acentuada de su producción en estados deficitarios de selenio, su actividad sí se ha visto disminuida en riñón e hígado (Gallegos *et al.*, 1997).

Yodotironina Deyodinasa

La principal función de la yodotironina deydinasa (DI) es endocrina y consiste en regular la actividad de las hormonas tiroideas mayoritarias que son la triyodotironina (T3), con actividad biológica, y tiroxina (T4), biológicamente inactiva, catalizando la deydodonización de la T4 para formar la T3. Existen tres tipos: la DI-I se encarga de producir la mayoría de la T3 del sistema circulatorio y actúa en la tiroides y en tejidos periféricos; la DI-II se expresa en la glándula pituitaria, tiroides, corazón, placenta y en el sistema nervioso central, produciendo T3 de manera focalizada (intracelular) (Tapiero *et al.*, 2003); y finalmente, la DI-III está encargada de la degradación de la T3 a diferentes especies inactivas y se expresa en piel, placenta y cerebro (Beckett *et al.*, 2005; Rayman, 2012; Tapiero *et al.*, 2003).

Selenoproteína P

La selenoproteína P (SeIP) es la selenoproteína más abundante en el plasma sanguíneo y otro de los biomarcadores empleados para establecer el estatus de selenio. Se sintetiza principalmente en el hígado y se transporta al resto de los tejidos a través del torrente sanguíneo por lo que se cree que una de sus propiedades es la de suministrar selenio a los diferentes órganos. También actúa como antioxidante, protegiendo las células del endotelio de moléculas oxidantes (Burk *et al.*, 2003). En estados carenciales, su síntesis parece ser prioritaria frente a la de otras selenoproteínas como las GPx (Tapiero *et al.*, 2003).

Selenoproteína de 15 kDa

Esta selenoproteína se ha identificado en elevadas cantidades en hígado y próstata de individuos sanos (Rayman, 2005). Se cree que podría contribuir al control del correcto plegamiento de proteínas. Su función es desconocida pero se piensa que podría presentar función antioxidante. Se encuentra en bajos niveles en células cancerígenas de pulmón, mama, próstata e hígado por lo que inicialmente se le asignó una función protectora contra el cáncer (Hatfield *et al.*, 2014). Sin embargo, también se ha observado que al inhibir esta selenoproteína, se producía una disminución del cáncer de colon en ratas y en células humanas (en menor medida), por lo que su papel frente al cáncer no estaría totalmente establecido (Irons *et al.*, 2010; Tsuji *et al.*, 2011; Tsuji *et al.*, 2012).

Otras selenoproteínas

Además de las ya comentadas, existen otras selenoproteínas de las que no se conocen aún muchos detalles. Entre ellas destaca la ***selenofosfato sintetasa***, que es una de las enzimas que intervienen en la biosíntesis de selenoproteínas a través de la catálisis de la producción de selenofosfato (Beckett *et al.*, 2005).

Por otro lado se encuentran la ***selenoproteína W***, de la que se piensa puede poseer propiedades antioxidantes en el músculo cardíaco y el esquelético (Beckett *et al.*, 2005), y la ***selenoproteína de 18 kDa*** localizada en la membrana mitocondrial de tejidos como el riñón, hígado o cerebro y cuya función se relaciona con el sistema endocrino (Kyriakopoulos *et al.*, 2002).

Respecto a la ***selenoproteína de 34 kDa***, existe cierta controversia sobre si se trata de una selenoproteína independiente o de una variedad de la GPx4. Se encuentra en la cápsula mitocondrial de los espermatozoides y su función se relaciona con la fertilidad, ya que su deficiencia origina esterilidad por falta de movilidad de los espermatozoides (Behne *et al.*, 1997).

Una vez que penetra en el organismo, el selenio debe recorrer un arduo camino hasta llegar a su incorporación a biomoléculas o a su excreción. Las rutas metabólicas que siguen las diferentes especies de selenio en el organismo no son del todo conocidas, sin embargo, gracias a los estudios realizados en los últimos años, se barajan una serie de hipótesis al respecto. Dependiendo de la especie química y en ocasiones de su concentración, el selenio sigue una u otra ruta hasta llegar a su cometido final. La Figura 1 muestra algunas de las especies de selenio más relevantes desde el punto de vista biológico y, por otro lado, en la Figura 2 se propone una ruta metabólica para el selenio en humanos (Navarro-Alarcón *et al.*, 2008; Rayman *et al.*, 2008) con el seleniuro de hidrógeno (H_2Se) como elemento central.

Una vez ingerido, el selenio tanto orgánico como inorgánico, se transforma a seleniuro de hidrógeno o algún equivalente para sintetizar las selenoproteínas o ser excretado. Se habla de seleniuro o equivalente ya que el seleniuro es un compuesto altamente reactivo por lo que podría no encontrarse en su forma libre, sino unido a alguna molécula (Suzuki, 2005). El H_2Se puede convertirse en selenofosfato (HSePO_4^{2-}) por acción de la selenofosfato sintetasa, para dar posteriormente la SeCys unida al ARNt. Su inserción en la cadena peptídica se produce de manera específica mediante el UGA codón por un complejo proceso aún sin elucidar (Rayman, 2005). Otra vía que puede tomar el H_2Se es la excreción tras varias metilaciones bien a través de la orina o del aliento. La oxidación del seleniuro de hidrógeno puede dar lugar a la producción de superóxidos y otras especies de oxígeno reactivas con efectos tóxicos para la salud (Navarro-Alarcón *et al.*, 2008; Rayman *et al.*, 2008). El metilselenol (CH_3SeH) es otro compuesto importante que se encuentra en equilibrio con el H_2Se , y ambos han sido relacionados con las propiedades anticancerígenas que presenta el selenio (Rayman *et al.*, 2008).

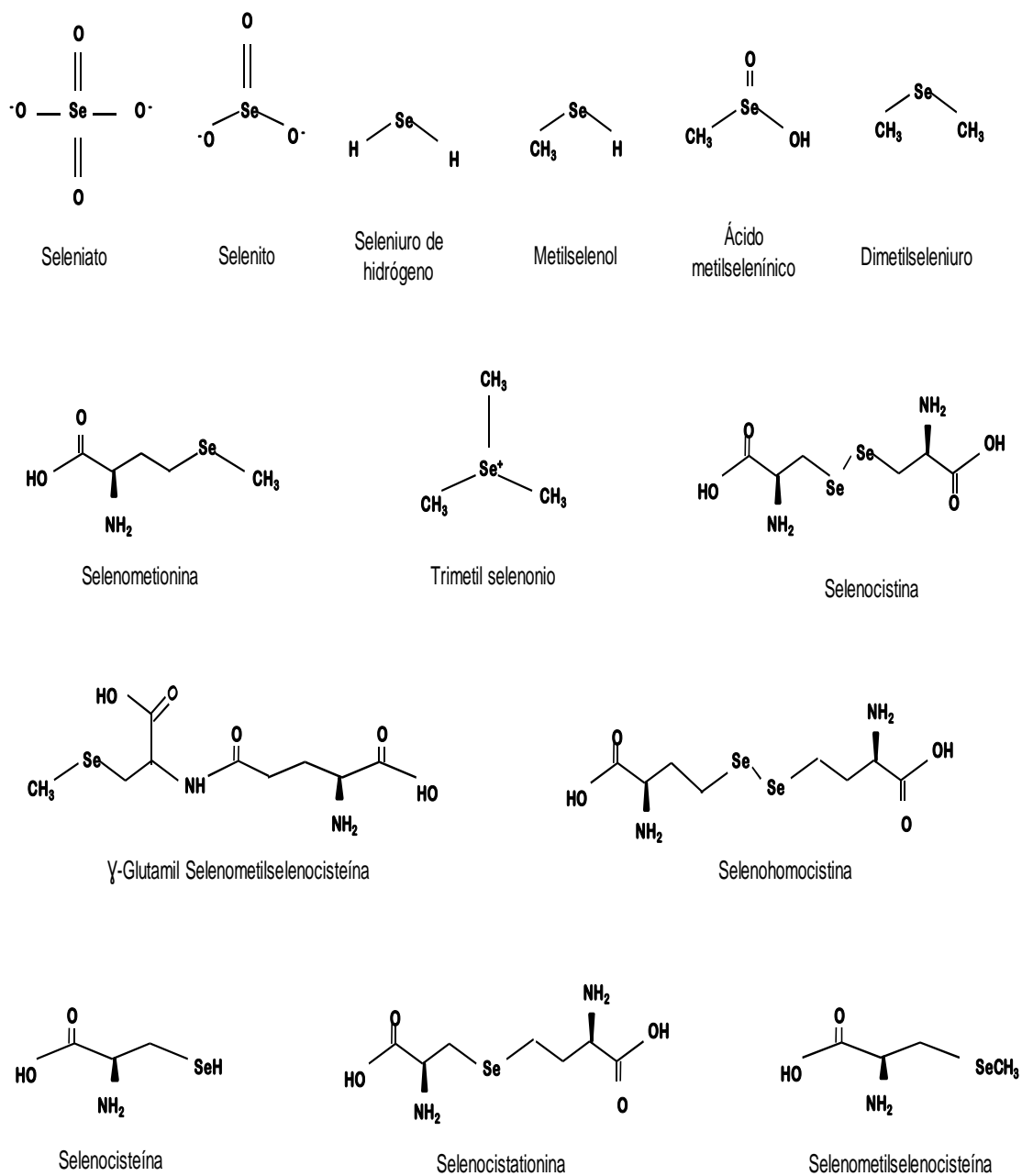


Figura 1. Compuestos de selenio de relevancia biológica.

Las distintas formas de selenio inorgánico presentan ciertas diferencias en cuanto a su metabolismo. Por un lado el selenito se incorpora a los glóbulos rojos donde es fácilmente reducido a seleniuro de hidrógeno mediante el glutatión. Después se une a la albúmina, encargada de su transporte, que lo traslada al hígado. A diferencia del selenito, el seleniato necesita condiciones de reducción más enérgicas para obtener el seleniuro de hidrógeno, teniendo que pasar primero a selenito. De esta forma, el seleniato es incorporado a los hepatocitos mediante el sistema de transporte del fosfato y es parcialmente excretado a la orina. Una vez en el hígado, ambos son utilizados para sintetizar las selenoproteínas que después son liberadas al torrente sanguíneo para distribuirse por los distintos órganos (Suzuki, 2005). Las diferencias entre selenito y seleniato fueron corroboradas por Kobayasi *et al.* (2001), al inyectar a ratas ambas especies inorgánicas marcadas isotópicamente, lo que permite identificar el origen de los metabolitos resultantes. Efectivamente, se observó una mayor eficiencia en la utilización del selenito por el organismo, posiblemente debido a que el seleniato es parcialmente excretado antes de llegar a utilizarse. Una vez en el hígado, ambas formas inorgánicas del selenio presentan un comportamiento similar.

Contrariamente a la relativa sencillez de la ruta metabólica del selenio inorgánico, los compuestos orgánicos de selenio utilizan rutas mucho más sofisticadas para producir el seleniuro de hidrógeno. Se piensa que mediante la acción de liasas, la mayoría de los selenoamino ácidos pasan a seleniuro de hidrógeno. La SeCys del organismo se convierte directamente en seleniuro de hidrógeno a través de la β -liasa. También, mediante esta misma enzima, la selenometilselenocisteína (SeMeSeCys) y la γ -glutamyl-SeMeSeCys pueden transformarse en CH_3SeH y a partir de ahí ser convertidos a seleniuro de hidrógeno o ser excretados (Navarro-Alarcón *et al.*, 2008; Rayman *et al.*, 2008).

La SeMet puede transformarse a SeCys mediante la ruta de la trans-selenización, de la misma manera que la Met se convierte en Cys por la trans-sulfuración. Esta ruta conlleva varios pasos formando Se-homocisteína y Se-cistationa como productos intermedios. Se ha sugerido que la SeMet también podría dar lugar al CH_3SeH a través de la acción de la γ -liasa en caso de exceso

de SeMet (Suzuki, 2005), aunque esta reacción parece ser menos efectiva que la llevada a cabo por la β -liasa en la SeMeSeCys (Ohta *et al.*, 2009). La SeMet es incorporada a las proteínas sustituyendo a la Met de manera inespecífica, a través del mismo codón que ella (AUG), ya que el ^{Met}ARNt no distingue entre ambas, y forma así las llamadas proteínas que contienen selenio (Suzuki, 2005). Esta sustitución no altera la estructura de la proteína de manera significativa, sin embargo, la actividad enzimática sí podría verse modificada en cierta medida si se produce cerca del centro activo debido a la diferencia de hidrofobicidad entre los grupos CH₃Se y CH₃S (Shrauzer, 2000). El nivel de incorporación de la SeMet a proteínas depende de la relación SeMet/Met y de la dosis ingerida, ya que ante un consumo bajo de Met, la SeMet se incorpora en mayor medida (Shiobara *et al.*, 1998). De esta manera, la SeMet que no es inmediatamente metabolizada puede ser utilizada posteriormente como fuente de selenio, puesto que puede almacenarse durante largos períodos de tiempo en el organismo (en riñón, hígado, páncreas, estómago, músculo esquelético) en proteínas que, en caso de necesidad, se degradarían liberando la SeMet en su forma libre, pasando después a SeCys mediante la ruta de la trans-selenización (Shrauzer, 2000; Suzuki, 2005). Sin embargo, en caso de exceso, la SeMet podría quedar retenida de forma irreversible en proteínas del pelo y en glóbulos rojos, de forma que no se pudiese disponer de ella en un futuro (Shiobara *et al.*, 1998). Puesto que los animales superiores no son capaces de sintetizar Met tampoco podrían producir SeMet, por lo que en caso de una ingesta únicamente en forma de selenio inorgánico, sólo podrían sintetizarse selenoproteínas pero no se formarían proteínas que contienen selenio (Shrauzer, 2000).

La eficacia de incorporación del selenio inorgánico es mayor que en las especies orgánicas, pero también es excretado a mayor velocidad. Este hecho quedó patente en un estudio realizado por Suzuki *et al.* (2006) en ratas a las que les administró por vía oral diferentes especies de selenio, orgánicas e inorgánicas, que se hallaban marcadas isotópicamente. Mediante el uso de ⁷⁶SeMeSeCys, ⁷⁷SeMet y ⁸²Se(IV) se demostró una mayor eficacia del selenito para incorporarse a las selenoproteínas en el torrente sanguíneo pero también en la orina para ser excretado. También se encontraron las especies orgánicas intactas en los órganos hígado y riñón, no siendo

así en el caso del selenito. La formación de especies metiladas a partir de la SeMeSeCys, fue muy superior comparada con el resto de especies, poniendo de manifiesto su elevada capacidad para formar CH₃SeH. Por otro lado, otro estudio llevado a cabo con ⁷⁶SeMeSeCys, ⁷⁷SeMet y ácido metilselenínico (⁸²MSA), mostró una mayor excreción de selenio a través de especies derivadas del MSA y SeMeSeCys que de las derivadas de la SeMet, tanto en orina como en aliento, lo que se puede explicar por la acumulación de selenio en forma de SeMet en el organismo (Ohta *et al.*, 2009).

Finalmente, la excreción de selenio se produce principalmente a través de la orina en forma de selenoazúcares (1β-selenometil-N-acetilgalactosamina) (Gammelgaard *et al.*, 2012). Ante niveles excesivos de selenio, éste también se ha encontrado en el organismo como trimetilselenonio (TMSe), y en estos casos incluso se han observado otras vías de detoxificación del mismo, como el pelo (como proteínas que contienen selenio) o mediante su exhalación en el aliento en forma de dimetilseleniuro (DMSe) (Navarro-Alarcón *et al.*, 2008; Ohta *et al.*, 2009; Rayman *et al.*, 2008).

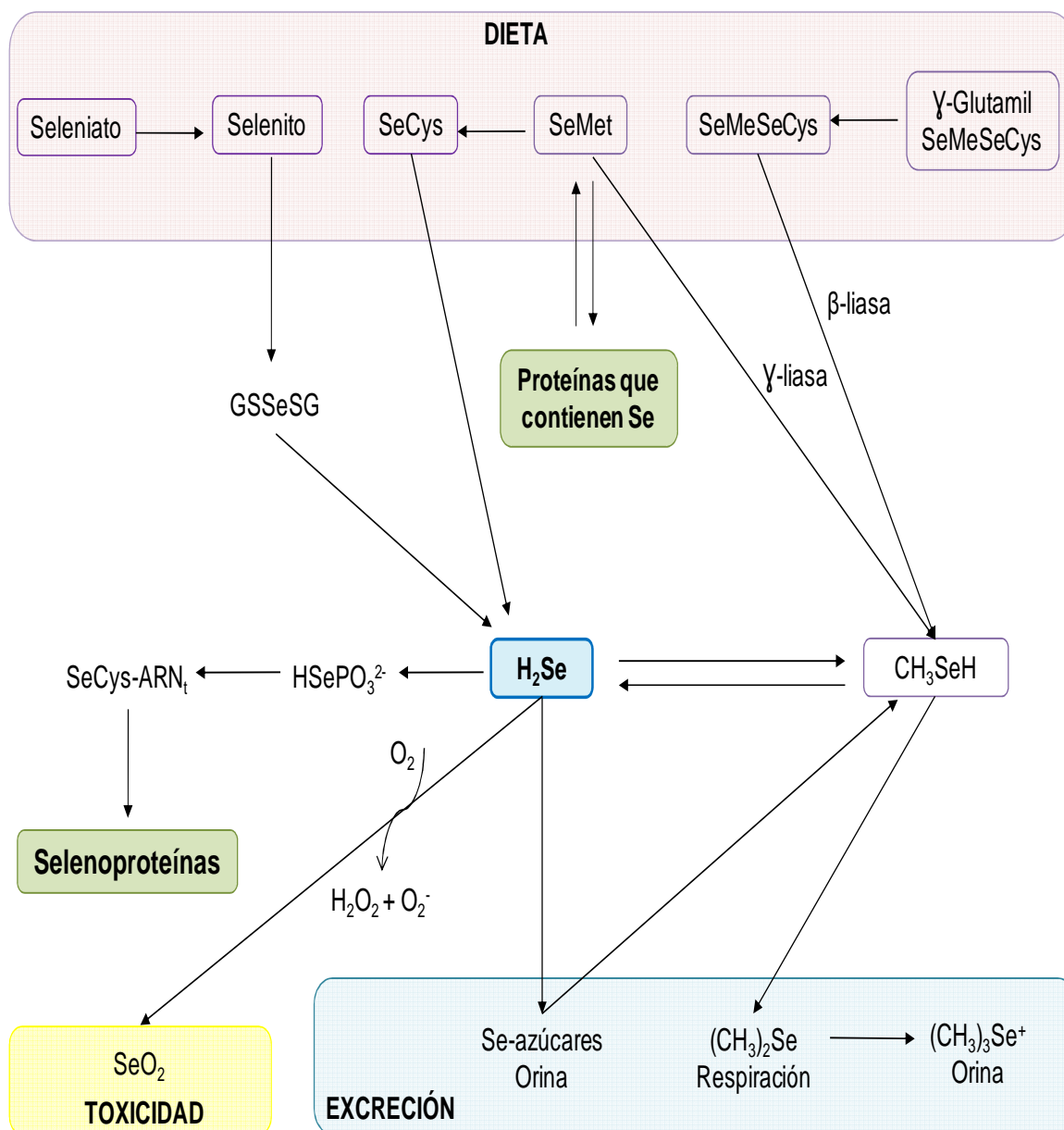


Figura 2. Ruta metabólica propuesta para el selenio en seres humanos (Navarro-Alarcón *et al.*, 2008; Rayman *et al.*, 2008).

II.1.1.2. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE SELENIO

La participación del selenio en importantes funciones biológicas hace que sea crucial una ingesta adecuada de este elemento para un buen funcionamiento del organismo. La deficiencia de selenio puede producir una reducción en la expresión de las selenoproteínas y de esta manera afectar a los procesos biológicos en los que éstas están involucradas. En casos de deficiencia moderada, el selenio se incorpora de manera preferente en las selenoproteínas con funciones biológicas más importantes, manteniendo un nivel de selenio lo más óptimo posible en determinados órganos, como el cerebro, el sistema endocrino y el reproductor, generando una disminución del contenido de selenio en órganos como el corazón y el músculo esquelético (Beckett *et al.*, 2005; Patching *et al.*, 1999; Rayman, 2012). El aporte de suplementos de selenio posibilita que se pueda revertir este estado y la recuperación parcial o total de las enfermedades producidas por la deficiencia de selenio, que se comentarán posteriormente (Tapiero *et al.*, 2003; Rayman, 2012).

El principal aporte de selenio a los seres vivos se produce a través de la dieta. El contenido de selenio en vegetales y, por ende, en animales está directamente relacionado con la concentración y biodisponibilidad del mismo en el suelo. En regiones donde la concentración de selenio en el suelo es baja se han observado enfermedades que han sido relacionadas con la deficiencia de este elemento y que, en algunos casos, han llegado a ser endémicas. Las regiones de Corea del norte, Europa del este, Nueva Zelanda, Nepal, Tíbet, África central y la República del Congo destacan por su bajo contenido de selenio en suelo. China, debido a su elevada extensión, presenta regiones tanto con exceso como deficientes en selenio (Tapiero *et al.*, 2003; Rayman, 2012). Se estima que millones de personas en el mundo podrían tener un estatus deficiente de selenio (Rayman, 2005). Las enfermedades ligadas a estados carenciales de selenio se conocen desde los años 50. Durante este período se observó que el ganado de diferentes países con niveles bajos de selenio en el suelo presentaba trastornos reproductivos, disminución del crecimiento y la enfermedad del músculo blanco, una miopatía cardíaca y del músculo esquelético que afecta principalmente a terneros y corderos (Rayman, 2000).

En humanos las enfermedades asociadas a la carencia de selenio más conocidas son la enfermedad de Keshan y la de Kashin-Beck. La enfermedad de Keshan es una miocardiopatía que afecta principalmente a niños y, en menor medida, a mujeres en edad fértil. Debe su nombre a la región del noroeste de China donde se descubrió. Se manifiesta como una insuficiencia crónica de la función cardíaca, arritmias y un tamaño del corazón anormalmente grande. Esta enfermedad endémica llegó a alcanzar en los años 40 hasta un 80% de mortalidad. Tras la administración profiláctica de Se, se disminuyó drásticamente este porcentaje por debajo de un 30%. (Combs, 2001; Rayman, 2002). Por otro lado se encuentra la enfermedad de Kashin-Beck, una osteoartropatía degenerativa endémica en regiones rurales de China, Tíbet y Siberia. Afecta a huesos y cartílagos, produciendo una malformación en ellos que produce atrofia y necrosis. Mientras que las articulaciones son más alargadas de lo normal, los dedos y extremidades se acortan, llegando a producir en casos severos enanismo. Esta afección comienza en la infancia y pubertad y continúa hasta que cesa el crecimiento del individuo (Rayman, 2002; Rayman, 2005; Tapiero *et al.*, 2003). Sin embargo, el único motivo para la incidencia de estas dos enfermedades no es sólo la deficiencia de selenio, ya que de ser así estarían más extendidas, por lo que existen otros cofactores responsables de su desarrollo. En el caso de la enfermedad de Keshan, se cree que una mutación del virus Coxsackie puede derivar en ella, mientras que la incidencia de la enfermedad de Kashin-Beck se ha asociado a bajos niveles de yodo y a la presencia de micotoxinas conjuntamente con compuestos de descomposición de suelos como el ácido fúlvico (Rayman, 2005; Rayman, 2012; Tapiero *et al.*, 2003). Del mismo modo, la deficiencia de selenio podría favorecer el desarrollo de enfermedades causadas por otros factores, como por ejemplo el bocio o el cretinismo, que son consideradas enfermedades derivadas principalmente de la deficiencia de yodo, y que en estudios llevados a cabo en África central, se ha encontrado una mayor prevalencia de estas enfermedades en zonas con bajo contenido de selenio en suelo respecto a zonas con elevada concentración del mismo (Combs, 2001).

La virulencia del VIH podría estar también ligada a la deficiencia de selenio, existiendo relación entre el índice de mortalidad de pacientes infectados y su estatus de Se (Rayman 2012). Un estudio realizado por Beck *et al.* (2004) demostró que la deficiencia de selenio podría derivar en mutaciones del RNA viral, que podrían formar cepas más virulentas de diferentes virus. Este hallazgo podría suponer que la deficiencia de selenio no sólo afectaría al VIH o Cocksackie, sino que también podría aumentar el riesgo de enfermedades causadas por otros virus como hepatitis, sarampión o gripe (Combs, 2001).

Además, niveles insuficientes de selenio están asociados a la infertilidad, produciendo problemas en la movilidad de los espermatozoides y una mayor incidencia de abortos y preeclampsia en mujeres. Algunos estudios indican que la eliminación de determinadas selenoproteínas disminuye la calidad del semen y la fertilidad en ratones (Ahsan *et al.*, 2014), mientras que Barrington *et al.* (1997) observaron abortos recurrentes en mujeres con bajo nivel de selenio en plasma comparado con aquellas con niveles adecuados. Sin embargo, en los casos de aborto y preeclampsia se ha observado una excesiva inflamación, lo cual podría producir una disminución del selenio en plasma, por lo que no se sabe aún si el bajo nivel de selenio podría ser la consecuencia o la causa (Rayman, 2012).

Por otro lado, numerosos estudios sugieren que la deficiencia de selenio se halla ligada a problemas en el sistema inmune y riesgo de enfermedades coronarias. Finalmente, se han encontrado bajos niveles de selenio en plasma en individuos con Alzheimer, depresión, ansiedad y confusión, y se ha asociado su deficiencia con la senilidad y una aceleración del decaimiento cognitivo en personas mayores (Rayman, 2000; Rayman, 2012).

II.1.1.3. TOXICIDAD DEL SELENIO

En sus orígenes el selenio fue considerado un elemento tóxico, ya que los primeros efectos observados de este elemento fueron perjudiciales para la salud. Las primeras evidencias de intoxicación por selenio o selenosis se observaron en 1856 en el ganado que pastaba en las

zonas seleníferas de Dakota y Nebraska, y que sufrieron de una afección necrótica en las pezuñas así como pérdida de pelo de la cola y la crin. Sin embargo, no fue hasta los años 30 cuando se asoció dicha enfermedad al elevado contenido de selenio presente en el suelo de la región (Hatfield *et al.*, 2014). Países como Venezuela, Canadá, Japón, Estados Unidos y algunas regiones de China presentan altas cantidades de Se en plasma, directamente relacionados con el contenido de este elemento en el suelo (Rayman, 2012).

Afortunadamente los casos de toxicidad por selenio en humanos son más escasos. La exposición aguda a elevados niveles de selenio produce hipotensión, aflicción respiratoria y mal aliento, estado reversible al volver a niveles normales de selenio. La sobredosis crónica suele producirse por ingesta de alimentos con alto contenido en Se y presenta síntomas como pérdida de pelo, uñas y dientes, lesiones cutáneas, ictericia, polineuritis y afecciones gástricas. Los primeros casos de selenosis crónica se observaron en los años 60 en Hubei, China, donde los suelos contenían cerca de 8 mg Se/kg. Sin embargo, la población más susceptible de sufrir síntomas de toxicidad es aquella que trabaja en la industria del selenio y se halla expuesta a sus compuestos volátiles (Combs, 2001; Comisión Europea, 2000).

En general, se habla de una mayor toxicidad aguda de las especies inorgánicas de selenio frente a las orgánicas, aunque en humanos no se hayan encontrado evidencias de ello, siendo el selenito ligeramente más tóxico que el seleniato (Rayman *et al.*, 2008). Contrariamente, el Comité Científico de Alimentación de la Comunidad Europea, sugirió que los compuestos orgánicos de selenio como la SeMet o aquellos presentes en la levadura selenizada, al ser eliminados de manera más lenta del organismo, podrían acumularse en los tejidos y resultar más nocivos ante exposiciones crónicas al selenio (Comisión Europea, 2000). Esta opinión se basa en estudios donde se observó que el nivel de selenio en plasma y sangre alcanzaba un nivel máximo tras una suplementación con levadura selenizada durante hasta 6 meses (Rayman 2004). Sin embargo, a día de hoy no existen estudios que demuestren que la levadura selenizada provoque una continua acumulación de selenio en los tejidos, ni que produzca toxicidad. De hecho, estudios llevados a cabo durante largos períodos de hasta dos años (en el caso de la dosis

de Se menor), muestran que la administración de levadura selenizada no produjo efectos tóxicos en los individuos a pesar de utilizar dosis de 200-800 µg Se/día (Rayman *et al.*, 2008). Por otro lado, se piensa que la SeCys podría presentar una toxicidad crónica equivalente a la del selenito, siendo ambas más tóxicas que la SeMet. Este efecto se observó en ratones a los que la administración de una elevada dosis de SeCys produjo toxicidad hepática, presumiblemente por la inhibición de la metilación del selenio, lo que se traduciría en la acumulación de seleniuros tóxicos (Hasegawa *et al.*, 1996). Debido al doble papel del selenio, tóxico y esencial, y a que sus efectos en la salud aún no se encuentran completamente esclarecidos, es importante prestar especial atención al uso de suplementos de selenio ya que podría producirse una intoxicación al intentar prevenir o curar algún tipo de enfermedad (Rayman, 2012).

II.1.1.4. EFECTO PROTECTOR DEL SELENIO FRENTE A ENFERMEDADES

Como se ha puesto de manifiesto en los apartados anteriores, el selenio presenta diversos efectos beneficiosos para la salud y está relacionado con la prevención o curación de determinadas enfermedades. La función antioxidante de las selenoproteínas está estrechamente ligada a estos efectos. En los últimos años se han realizado numerosos ensayos clínicos en humanos para determinar los efectos del selenio en la salud, comprobándose su importancia en muchos de los sistemas que componen el cuerpo humano.

El sistema inmune es uno de los principales afectados por el estrés oxidativo, donde las selenoproteínas juegan un importante papel. Así, se ha observado que la suplementación con selenio, incluso en individuos con niveles adecuados, presenta un efecto estimulador del sistema inmune. Este efecto es especialmente importante en personas mayores o enfermos de cáncer en tratamiento, puesto que su respuesta inmune se ve frecuentemente comprometida. Estudios llevados a cabo en ancianos en el estado de Arizona evidenciaron que una suplementación con 400 µg Se/día en forma de levadura selenizada aumentaba hasta un 27% el número linfocitos T, principales responsables de coordinar la respuesta inmune celular (Wood *et al.*, 2000). Este

efecto en el sistema inmune podría encontrarse ligado a la influencia en la progresión e incidencia de enfermedades víricas como es el caso del VIH. En un estudio realizado en pacientes infectados por dicho virus, se observó un descenso de las infecciones más graves asociadas a esta enfermedad al administrarles una dosis de 200 µg Se/día en forma de levadura enriquecida en selenio (Burbano *et al.*, 2002). En cuanto a otras enfermedades autoinmunes como la tiroiditis, se ha observado que la suplementación de selenio produce un efecto beneficioso en la tiroiditis de Hashimoto, la forma más común de esta enfermedad (Toulis *et al.*, 2010). Además, el selenio ha demostrado ser efectivo en la disminución del hipotiroidismo permanente y la disfunción tiroidea que se desarrollan comúnmente tras el parto en mujeres con tiroiditis previa (Negro *et al.*, 2007). El hipertiroidismo también se ha visto disminuido ante la suplementación de 100 µg/día de selenio (Marcocci *et al.*, 2011). Del mismo modo, la administración de selenito sódico en elevadas dosis a pacientes con septicemia redujo su mortalidad (Forceville, 2007), así como un aporte extra de selenio también produjo mejora en pacientes asmáticos (Rayman, 2012).

En cuanto al sistema reproductor, unos niveles adecuados de selenio en los testículos son necesarios para un correcto desarrollo y actividad de los espermatozoides, ya que interviene en la maduración del espermatozoide y actúa como componente estructural a través de determinadas selenoproteínas (Ahsan *et al.*, 2014). La suplementación con 100 µg Se/día de varones subfértiles con estatus de selenio deficiente incrementó la movilidad de los espermatozoides y aumentó un 11% su fertilidad (Scott *et al.*, 1998). Sin embargo, otro estudio realizado con hombres sanos mostró una disminución de la movilidad de los espermatozoides (Hawkes *et al.*, 2001).

A pesar de que no se han encontrado datos consistentes sobre el papel del selenio en la prevención de enfermedades coronarias o la disminución de la mortalidad por efecto de las mismas, se le asocia un efecto beneficioso en este campo ya que se sabe que las selenoproteínas previenen la oxidación lipídica, inhiben la agregación de las plaquetas y reducen la inflamación. Se ha observado una relación inversa entre el nivel de selenio en plasma, especialmente cuando

el nivel es bajo, y el riesgo de padecer enfermedades de corazón (Rayman, 2012). Sin embargo, también se han relacionado elevados niveles de selenio con un alto contenido de colesterol (Rayman *et al.*, 2011). Mientras que en algunos estudios llevados a cabo en Estados Unidos en población con un estatus de selenio adecuado la suplementación con selenio no mostró beneficios en este tipo de enfermedad (Stranges *et al.*, 2006), aquellos realizados con individuos con niveles bajos de selenio en plasma experimentaron un aumento de la actividad de la GPx1, una de las principales enzimas implicadas en el metabolismo cardiaco (Rayman *et al.*, 2011). Estos resultados tan contradictorios podrían deberse a una relación en forma de U entre el estatus de selenio y las enfermedades cardiovasculares. Es decir, en función del estatus de selenio de los individuos, la suplementación podría ser o no beneficiosa, y a partir de un umbral en el cual la actividad de las selenoproteínas ya estaría optimizada, el aporte extra de selenio dejaría de suponer un beneficio en este campo (Rayman, 2012).

En el sistema nervioso, el selenio juega un papel importante en la actividad cerebral, por ello ante estados carenciales recibe un aporte prioritario a expensas de otros órganos. La suplementación con selenio ha demostrado ser beneficiosa en enfermedades como la epilepsia, problemas cognitivos, senilidad, ansiedad, depresión y en la mejora del estado de ánimo (Rayman, 2000). La administración de una dosis elevada de selenio (ligeramente superior a 200 µg/día) supuso una mejora del estado de ánimo de los participantes, con disminución de la ansiedad y confusión, produciendo mayor lucidez, serenidad y confianza en sí mismos (Finley *et al.*, 1998).

El papel que juega el selenio frente al cáncer es quizá el que más interés genera debido a la necesidad de tratamientos que lo prevengan o erradiquen y a lo poco que se sabe acerca de esta enfermedad. Sin embargo, es también uno de los aspectos del selenio que más polémica ha suscitado. Se ha observado que la incidencia de carcinogénesis se ve incrementada en países donde la ingesta de selenio es baja (Rayman, 2000), es decir, la deficiencia de este elemento, entre otras cosas, produce cierta susceptibilidad a padecer cáncer. Desde los años 70 se han realizado un gran número de estudios al respecto, poniendo de manifiesto una disminución de

dicha susceptibilidad a desarrollar esta enfermedad así como de su mortalidad gracias a la suplementación de selenio, aunque el mecanismo por el cual se produce no está aún claro. Diferentes estudios llevados a cabo en animales han evidenciado el efecto beneficioso de dosis supranutricionales de Se en cáncer de pulmón, esófago, hígado, próstata, colon, tiroides, vejiga, gástrico y de piel (Rayman, 2000; Rayman, 2012). Sin embargo, en estudios realizados en seres humanos, en muchos de estos casos los efectos beneficiosos se manifestaban cuando el individuo presentaba unos niveles de partida de selenio bajos y se le suministraba un suplemento de selenio. En contraposición, si el sujeto ya presentaba unos niveles adecuados de selenio, el tratamiento producía un aumento del riesgo de padecer cáncer, como por ejemplo en el caso del cáncer de piel (Clark *et al.*, 1996).

El ensayo de Prevención Nutricional contra el Cáncer (NPC) fue pionero en este tipo de estudios en humanos. Aunque inicialmente se centró en estudiar los efectos del selenio sobre la incidencia del cáncer de piel, los resultados más reveladores se observaron en otros tipos de cáncer. Los efectos observados tras la suplementación de 200 µg Se/día en forma de levadura selenizada fueron una disminución del 50% en la mortalidad por cáncer y una reducción de los casos de cáncer de próstata y de pulmón. Sin embargo, fueron los pacientes con un estatus de selenio inferior al 122 ng/mL los que experimentaron los efectos beneficiosos, mientras que los de mayor nivel de selenio aumentaron el riesgo de padecer cáncer de piel (Clark *et al.*, 1996; Dunffield-Lillico *et al.* 2002; Dunffield-Lillico *et al.*, 2003; Reid *et al.*, 2002).

Uno de los ensayos sobre el cáncer que más controversia ha generado es el ensayo sobre la influencia del Selenio y Vitamina E (individual y conjuntamente) en el Cáncer de Próstata (SELECT), ya que no se produjo disminución del cáncer y surgieron algunos casos de diabetes tipo II, además de observarse efectos adversos como alopecia y dermatitis (Ledesma *et al.*, 2011; Rayman, 2012). Se han planteado varias hipótesis para explicar estos resultados. Normalmente la levadura selenizada, la cual presenta un 60-70% de SeMet y el resto de otros compuestos de selenio, es utilizada como fuente de selenio en este tipo de estudios, mientras que el ensayo SELECT administró SeMet directamente, lo que podría sugerir que los

verdaderos responsables del efecto anticancerígeno de la levadura fueran compuestos de selenio distintos a la SeMet, o bien presentar un efecto sinérgico con la SeMet. Además, los participantes del estudio SELECT presentaban niveles de selenio altos al comienzo del mismo, lo que habría contribuido a superar la cantidad de selenio óptima, hecho que, como se comentó anteriormente, podría ser otro factor que provocara la disminución del efecto anticarcinogénico del selenio.

Los resultados obtenidos para el cáncer de próstata son bastante contradictorios. Mientras que en el estudio NPC la suplementación de selenio disminuyó la incidencia de cáncer de próstata en individuos con niveles bajos de selenio en plasma, en el ensayo SELECT la suplementación con selenio no tuvo ningún efecto. Estas diferencias sugieren que la suplementación con selenio tiene efecto en la incidencia de cánceres para aquellos individuos con un determinado nivel de selenio en plasma. Por otro lado, la suplementación de selenio ha resultado ser más efectiva en casos de cáncer avanzado que en los casos de cáncer primario, actuando en la prevención de su progresión (Rayman, 2012).

Actualmente se está llevando a cabo en Reino Unido el primer ensayo en seres humanos centrado en la prevención del cáncer de vejiga, el SELENIB, que prevé finalizar y emitir sus conclusiones a mediados de 2014 (Brinkman *et al.*, 2006).

Resumiendo, con la información de la que se dispone en la actualidad, se puede decir que el efecto anticarcinogénico del selenio puede explicarse en base a un aumento de la actividad de selenoproteínas con funciones antioxidantes y de regulación redox, pero no existe ninguna teoría establecida acerca del mecanismo. Sin embargo, las especies monometiladas de selenio, como son el metilselenol o el seleniuro de hidrógeno, han sido postuladas como las responsables de las propiedades anticarcinogénicas del selenio. Por ello, el selenito, SeMet o la SeMeSeCys son los compuestos de selenio más utilizados en estudios de prevención o tratamiento contra el cáncer, ya que se degradan fácilmente en dichas especies en el organismo (Tapiero *et al.*, 2003).

II. CAPÍTULO 2. EL SELENIO EN LOS ALIMENTOS

II.2.1. FUENTES DE SELENIO EN LA DIETA Y BIODISPONIBILIDAD

No cabe duda de la importancia del selenio para la salud. Sin embargo, sus dos caras, tóxica y esencial, dependiendo tanto de la especie química como de la concentración, exigen una especial atención a la hora de fijar las cantidades consideradas necesarias, así como al desarrollar suplementos nutricionales. La principal fuente de selenio en los seres humanos, excepto en casos de exposición laboral, es la dieta (Litov *et al.*, 1991). La Cantidad Diaria Recomendada (Recommended Dietary Allowance, RDA) de este elemento no posee un valor fijo y difiere en función del país. El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2000) establece una RDA de 55 µg/día de selenio tanto para hombres como para mujeres, mientras que la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN, 2011) distingue entre sexos y recomienda 55 y 70 µg/día para hombres y mujeres, respectivamente. La dosis de selenio recomendada depende de factores tales como la edad, sexo o región (Rayman, 2004). En general, su valor se establece teniendo en cuenta los requerimientos de selenio necesarios para una completa expresión de las selenoproteínas que sirven como biomarcadores del estatus de selenio. Dicho estatus se determina en plasma por el contenido de selenio total, GPx3 y SelP. Sin embargo, mientras que la GPx3 necesita sólo 35 µg/día para alcanzar su actividad óptima, la SelP requiere 49 µg/día (Ballihaut *et al.*, 2011). Actualmente, muchos países establecen sus RDA teniendo en cuenta sólo el selenio necesario para la expresión de la GPx3, lo cual podría no ser lo adecuado ya que no se estarían supliendo las necesidades para la correcta actividad de la SelP (Rayman, 2012). El Comité Científico de los Alimentos (SCF) sugiere que una ingesta de hasta 300 µg/día estaría dentro de los límites seguros y que los síntomas relacionados con la toxicidad de selenio se producirían entre 800-900 µg/día (SCF, 2000). No obstante, diferentes estudios han demostrado que una ingesta de 800 µg/día no produce toxicidad, lo que se ve reflejado en países de regiones seleníferas como Dakota del Sur, donde sus habitantes se han visto expuestos a dosis superiores a 700 µg/día sin desarrollar efectos adversos (Rayman, 2004).

El selenio entra a formar parte de la cadena alimentaria a través de las plantas, aunque su incorporación depende no sólo del contenido de selenio en el suelo y su geoquímica, sino de las condiciones de pH, la lluvia o la actividad bacteriana (Rayman, 2002), que pueden modificar la solubilidad de las especies de selenio y su contenido en el suelo. Como consecuencia de ello, la concentración de selenio en la dieta se encuentra ligada a su concentración en el suelo, por lo que el estatus de selenio de la población también lo estará. Dumont *et al.* (2006) recopilaron valores del contenido de selenio en suelo, alimentos ingeridos, plasma, orina y leche materna de individuos de diferentes países demostrando esta relación.

Las principales fuentes de selenio en la dieta son los cereales, la carne, el pescado y el marisco. Los productos lácteos y huevos contribuyen ligeramente a la ingesta recomendada, mientras que los vegetales y las frutas poseen un contenido de selenio bastante bajo (Combs, 2001). Las nueces de Brasil, el hígado y el cangrejo son los alimentos con mayor concentración de selenio, sin embargo, su ingesta diaria es demasiado pequeña para poder considerarse un aporte importante de selenio (Rayman, 2002). En la Tabla 1 se recogen las concentraciones aproximadas de selenio de alimentos con elevado contenido en este elemento (USDA, 2012).

Tabla 1. Concentración de selenio en alimentos con elevado contenido en este elemento.

Alimento	Concentración / µg Se por ración de alimento
Nueces de Brasil (ración = 28 g)	544
Pescado (ración = 85 g)	40-92
Carne (ración = 85 g)	18-28
Cereales (ración = 100 g)	13-50
Productos lácteos (ración = 125 g)	8-20
Vegetales y frutas (ración 130 g)	< 10

Los cereales y la soja contienen mayoritariamente SeMet, con pequeñas cantidades de selenito o SeCys, mientras especies del género *Allium*, como son *Allium cepa* (cebolla) o *Allium sativum* (ajo), o especies del género *Brassica*, como la especie *Brassica oleracea itálica* (brócoli), presentan SeMeSeCys y γ -glutamil SeMeSeCys (Pedrero *et al.*, 2009). Estas dos últimas especies son características de las plantas acumuladoras de selenio. No obstante, las nueces de Brasil, a pesar de ser consideradas acumuladoras de este elemento contienen SeMet como especie principal, por tanto las diferentes especies de selenio dependerán del metabolismo de cada tipo de planta (Rayman *et al.*, 2008).

En carnes y pescados, el hígado, riñón y el músculo son las partes que acumulan mayor cantidad de selenio, siendo su concentración variable en función del contenido de selenio en el suelo o el agua (Combs, 2001; Rayman, 2000). En dichos órganos el selenio se encuentra normalmente en forma de selenoproteínas o proteínas que contienen selenio, siendo la SeMet la principal especie presente en el músculo y la SeCys en hígado y riñón (Cabañero *et al.*, 2005a; Pedrero *et al.*, 2011). La ternera, pollo y el pescado suponen aproximadamente un 36% del aporte de selenio a la dieta mientras que los cereales y el pan pueden aportar cerca del 22% (Combs, 2001; Rayman, 2000).

Es importante tener en cuenta que no sólo es necesario ingerir una correcta cantidad de selenio, sino en una forma química adecuada, puesto que de ello depende la eficacia de su incorporación al organismo. Esto ha llevado a definir algunos términos como biodisponibilidad o bioaccesibilidad. De esta forma, la biodisponibilidad puede definirse como la fracción de nutriente ingerido que, tras ser absorbido e incorporado al torrente sanguíneo, es utilizada para las funciones fisiológicas o para su almacenamiento (Rayman *et al.*, 2008; Tapiero *et al.*, 2003). Ligado a este término se encuentra la bioaccesibilidad, que se conoce como el porcentaje del elemento que es soluble en el medio gastrointestinal en relación con el contenido total en el alimento y que es potencialmente asimilable (Thiry *et al.*, 2013; Cabañero *et al.*, 2004), pero para que el selenio sea biodisponible debe estar o convertirse en una especie biológicamente activa que le permita ser absorbido (Tapiero *et al.*, 2003). La biodisponibilidad se ve afectada

por factores como la presencia de otros metales, la ingestión concomitante de medicamentos, la propia composición de la dieta o factores fisiológicos como la edad, el estado nutricional, la lactancia o el embarazo (Pedrero *et al.*, 2006; Tapiero *et al.*, 2003; Thiry *et al.*, 2013; Welch *et al.*, 2005). Además, hay que tener en cuenta que durante el procesado o preparado de los alimentos puede haber pérdidas de nutrientes. De este modo, el procesado de los cereales, el pulido del grano o retirada de la piel de ciertos alimentos, así como su cocción supondría una disminución del contenido total o incluso una degradación de las especies presentes (Dewettinck *et al.*, 2008; Dumont *et al.*, 2006; Garvin *et al.*, 2011; Warburton *et al.*, 2007; Welch *et al.*, 2005). Este es el caso del trigo, arroz, cebolla, ajo, pan, etc.

La absorción del selenio proveniente de los alimentos es generalmente alta, alrededor de un 80%, siendo las especies orgánicas más biodisponibles que las inorgánicas. Estudios realizados con suplementos de selenio para comparar la biodisponibilidad de diferentes especies de selenio pusieron de manifiesto que las formas orgánicas parecen ser más biodisponibles que el selenito o el seleniato, puesto que son más efectivas aumentando el contenido de selenio en sangre, lo que sugiere una mayor absorción y retención. A pesar de ello, todas las especies fueron capaces de aumentar la actividad de la GPx (Rayman, 2004). La SeMet es la especie predominante de selenio en la dieta (Cabañero *et al.*, 2005a) y se cree que es la responsable de la elevada biodisponibilidad del selenio en los alimentos, ya que posee la capacidad de incorporarse en lugar de la metionina en las proteínas de músculo esquelético, los eritrocitos y la albúmina plasmática (Rayman *et al.*, 2008). Sin embargo, el selenio puede encontrarse en mayor o menor medida en sus diferentes formas químicas. Por este motivo, las fuentes de selenio con elevado contenido en SeMet, como los cereales o vegetales, presentan una elevada biodisponibilidad en comparación con los productos de origen cárnico, siendo especialmente baja en los pescados (Pedrero *et al.*, 2009), posiblemente debido a su interacción con los compuestos de mercurio (Cabañero *et al.*, 2004; Rayman, 2000). Contrariamente, los mariscos como la ostra o el mejillón presentan, además de un elevado contenido de selenio, una excelente biodisponibilidad (Cabañero *et al.*, 2004).

Mediante una digestión gastrointestinal *in vitro* puede determinarse la fracción bioaccesible o máxima concentración de un elemento disponible para su absorción (Cabañero *et al.*, 2004). Este tipo de estudios son una alternativa a los estudios realizados en humanos, presentando como ventajas su rapidez, sencillez y bajo coste económico. A pesar de ello, los resultados más fiables son los obtenidos *in vivo*. También existen otras metodologías complementarias para determinar la fracción biodisponible, y que se están utilizando en los últimos años como sustitutorias de los estudios en humanos. Éste es el caso del empleo de cultivos celulares para estudios de absorción. La línea celular Caco-2, que proviene del carcinoma de colon humano, muestra características comparables con las de células del epitelio intestinal humano, lo que consigue una buena correlación con la absorción, por ejemplo, de metales provenientes de alimentos, como ya estudiaron Glahn *et al.* (1996) para el hierro en los años 90. Desde estos años se han desarrollado muchos estudios utilizando este modelo celular, tanto para metales, como Fe, Zn, Ca, etc. (Lodemann *et al.*, 2013; Salunke *et al.*, 2012), como para compuestos de otra naturaleza, drogas, etc. (Artursson *et al.*, 2012). Posiblemente el mayor inconveniente de esta metodología sea que conlleva un mayor coste frente a la digestión gastrointestinal *in vitro*.

II.2.2. DESARROLLO DE ALIMENTOS ENRIQUECIDOS EN SELENIO

Se estima que millones de personas en todo el mundo no llegan a alcanzar el nivel de selenio establecido como necesario, de hecho, existen estudios donde se han recopilado los niveles de selenio en plasma y sangre de casi 70 países, demostrándose que más de la mitad sufrían estados de deficiencia de selenio. Este problema podría ser mayor de lo que se cree puesto que existe muy poca información disponible acerca de la mayor parte de África, América del Sur, Asia del Sur y Asia Central (Rayman, 2004). En varios países de Europa se ha observado una importante disminución de la ingesta y el estatus de selenio en los últimos años, lo cual se debe a un cambio en la procedencia del trigo consumido, ya que hasta mediados de los años 90 era común la importación de trigo proveniente de América del Norte y Canadá, debido a su alto contenido

en proteínas, lo que facilitaba el crecimiento de la masa del pan, y que además presentaba el valor añadido de contener elevadas concentraciones de selenio. Sin embargo, a partir de esta época se decidió disminuir la importación de trigo para aumentar el consumo de productos nacionales, y se comenzó a utilizar trigo cultivado en Europa para autoabastecerse (Rayman, 2002), afectando a la vez la ingesta y el estatus de selenio, como se reflejó en el Estudio de Nutrición y Dieta Nacional llevado a cabo en el Reino Unido durante los años 1994-1997 (Bates *et al.*, 2002; Gregory *et al.*, 2000).

Para suplir estas carencias ha surgido en los últimos años el desarrollo de alimentos funcionales enriquecidos en selenio. Un alimento funcional es aquel que proporciona beneficios para la salud, además de satisfacer las necesidades básicas de nutrientes y mantener sus características organolépticas (Committee on Opportunities in the Nutrition and Food Sciences, 1994; International Life Sciences Institute, 1999), aunque en la actualidad no existe un consenso universal a la hora de definir un alimento funcional. El desarrollo de este tipo de alimentos implica la adición de algún ingrediente no presente en el alimento o el aumento de la concentración de alguno de los componentes constituyentes del mismo (American Dietetic Association, 1999). Este concepto de alimento funcional se comenzó a utilizar en los años 80 en Japón, cuando se empezaron a emplear este tipo de alimentos para mejorar la salud de la población ante la desmesurada subida de los costes de sanidad (Arai, 1996). En la actualidad, en este país se les conoce como alimentos para uso específico de la salud (FOSHU) y cuentan con cerca de 300 productos.

Los alimentos funcionales, como se ha comentado, pueden originarse mediante la inclusión en el alimento de cualquier componente que produzca un efecto beneficioso para la salud, como por ejemplo es el caso de los ácidos grasos presentes en pescados como el atún, salmón, sardinas, caballa o arenque, los cuales son unos de los componentes más investigados para incorporar a alimentos funcionales, de manera que se han utilizado incluso en fórmulas para bebés (FDA, 2001). Otro tipo de alimentos funcionales son los llamados probióticos, que consisten en la adición de microorganismos considerados beneficiosos para la salud. Son uno de

los alimentos funcionales que ha generado mayor interés, a pesar de que la mayor parte de las evidencias de sus efectos en la salud provengan de estudios realizados en animales. Las bacterias *Lactobacillus* son unas de las más utilizadas en la elaboración de alimentos probióticos, incluso a nivel comercial (Hasler, 2002). Estos microorganismos, como se verá más adelante, se han utilizado en numerosos estudios para favorecer la incorporación y transformación del selenio, dando lugar a alimentos funcionales enriquecidos en selenio.

Los suplementos alimenticios de selenio se utilizan tanto para consumo animal como humano. En el caso de los animales, la suplementación de selenio (en forma de selenito) al ganado equino, ovino y bovino es una práctica común para la prevención de enfermedades (enfermedad del músculo blanco), para incrementar la productividad y facilitar la reproducción. En pocos casos la suplementación con selenio tiene como objeto la obtención de productos cárnicos o lácteos ricos en selenio, sino proteger al animal de enfermedades (Downs *et al.*, 2000). Durante los últimos 40 años, el uso de piensos enriquecidos con selenito sódico ha sido ampliamente utilizado para alimentar ganado en América del Norte y algunos países de Europa (Combs, 2001). En el caso de la acuicultura, también se pueden producir pescados enriquecidos en selenio mediante la administración de dietas con este elemento, e incluso pueden controlarse en su administración factores como la especie, sexo, edad, grado de madurez sexual y la propia dieta, que serán determinantes en la composición de la parte comestible del pescado (Schram *et al.*, 2008). Existen estudios de suplementación de selenio en el pez gato Africano (*Clarias gariepinus*) (Pedrero *et al.*, 2011) o en el salmón Atlántico (*Salmo salar*) (Lorentzen *et al.*, 1994), entre otros.

Los vegetales también pueden enriquecerse de diferentes formas, tanto mediante procesos de biofortificación como por adición directa durante su procesado, como se abordará más adelante. Por ejemplo, se han realizado estudios de enriquecimiento de selenio en brócoli (Pedrero *et al.*, 2007a), trigo (Hart *et al.*, 2011), lentejas (Pedrero *et al.*, 2007b) o rábanos (Pedrero *et al.*, 2006).

A pesar de que los alimentos funcionales han surgido por una necesidad de combatir deficiencias alimenticias, es importante utilizarlos con precaución. Además, es importante conocer de forma exacta y precisa la concentración en el suplemento. Un error de este tipo llevó a una intoxicación en los Estados Unidos debida al consumo de un suplemento líquido de selenio con una concentración 200 veces superior al reflejado en la etiqueta (MacFarquhar *et al.*, 2010). En Europa, el Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea (CE, 2006) regula la comercialización de los alimentos funcionales, y prohíbe específicamente alegar propiedades terapéuticas o curativas a estos productos, además de penalizar mensajes engañosos en los mismos.

II.2.2.1. BIOTRANSFORMACIÓN DE SELENIO POR PARTE DE MICROORGANISMOS: LEVADURAS Y BACTERIAS LÁCTICAS

En la naturaleza existen microorganismos capaces de acumular y biotransformar el selenio en su forma inorgánica. En algunos casos, esta capacidad se presenta como forma de protección ante la toxicidad de los oxoaniones de selenio (SeO_3^{2-} y SeO_4^{2-}), como es el caso de determinadas bacterias, como la *Anaeromyxobacter dehalogenans*, que reduce el Se(IV), altamente tóxico para ellas, a otra forma menos peligrosa, el Se(0) (He *et al.*, 2010). Otro ejemplo es el de la bacteria *Pseudomonas Fluorescens* K27, la cual detoxifica el medio reduciendo el Se(IV) y Se(VI) a Se(0) y, en cierta, medida a Se(-II) por biometilación, formando especies como dimetilseleniuro (DMSe), dimetildiselenio (DMDSe) y dimetilseleniosulfuro (DMSeS) (Hapuarachchi S. *et al.*, 2004). Esta acción también se ha observado en procesos de fermentación donde participan microorganismos, produciendo la biotransformación de selenito a formas orgánicas. Un ejemplo de ello es la obtención del Se-exopolisacárido (Se-ECZ-EPS-1), obtenido mediante fermentación por acción de la bacteria *Enterobacter Cloacae* Z0206 al adicionar Se(IV) al medio de cultivo de dicha bacteria. Esta bacteria está presente en el aparato digestivo humano y lleva a cabo la fermentación láctica, de forma que este compuesto de

selenio podría formarse en el interior del organismo, por lo que su efecto sobre la respuesta inmune fue estudiado por Xu *et al.* (2009).

Por otro lado, diferentes bacterias del género de *Lactobacillus* también han demostrado su capacidad para biotransformar selenito en compuestos orgánicos de selenio. Esta bacteria Gram positiva posee efectos beneficiosos para la salud, entre ellos la prevención de tumores y una mejora de la respuesta inmune (Yazdi *et al.*, 2013). Por ello, se ha estudiado su combinación con el selenio para buscar un mayor efecto beneficioso para la salud. En base a esto, la elaboración de yogur enriquecido en Se(IV) mediante fermentación por parte de *Lactobacillus bulgaricus* dio lugar a la producción de selenocistina (SeCys₂) y SeMeSeCys (Alzate *et al.*, 2008). Además, la presencia de selenio disminuye la expresión de proteínas como las chaperonas, aliviando por tanto las condiciones de estrés de las bacterias (Palomo *et al.*, 2014). También se han realizado estudios con *Lactobacillus brevis* en presencia de dióxido de selenio, generándose nanopartículas de selenio, las cuales han producido una mayor respuesta en el sistema inmune, ayudando a reducir el cáncer de mama estudiado en ratones (Yazdi *et al.*, 2013).

Siguiendo esta línea de procesos de biotransformación de selenio por parte de microorganismos, la levadura selenizada es uno de los suplementos nutricionales más estudiados hoy en día, siendo además el más utilizado en ensayos en humanos para estudiar el efecto beneficioso del selenio en la salud y sus propiedades anticancerígenas (Burbano *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 1997; Clarck *et al.*, 1996). Su producción se basa en la capacidad de la *Saccharomyces cerevisiae* para incorporar elevadas cantidades de selenio, hasta 3000 µg Se/g, transformando el selenio inorgánico en selenio orgánico, principalmente en forma de SeMet, que es incorporada a proteínas de la levadura o es asociada físicamente a macromoléculas, especialmente constituyentes de paredes celulares. Las importantes propiedades nutricionales de la levadura selenizada han generado gran interés en la identificación de las especies de selenio diferentes a la SeMet presentes en la misma, sin embargo y a pesar de la elevada concentración de selenio, su determinación es difícil. Dependiendo de los métodos de extracción y del lote o

marca de la levadura selenizada, los resultados tanto de rendimiento como de especies determinadas puede llegar a variar notablemente (Rayman, 2004). Recientemente se han identificado en la levadura selenizada las especies metil-Se-glutación y Se-glutación, que presentan un enlace S-Se (Goenaga Infante *et al.*, 2006). Además, también se han observado pequeñas cantidades de SeMeSeCys, que es uno de los precursores del metilselenol, considerado un potencial agente anticancerígeno (Rayman, 2004). Su producción, relativamente sencilla y económica, consiste en cultivar células de *Saccharomyces cerevisiae* en un medio de cultivo rico en nutrientes y enriquecido en selenito. La levadura posee una matriz muy rica en proteínas, factor importante puesto que el selenio se incorpora a éstas (Rayman, 2004; Ruíz Encinar *et al.*, 2003a). El proceso de elaboración debe estar perfectamente controlado, ya que de no ser así los productos obtenidos podrían no ser los esperados, lo que cambiaría las propiedades de la levadura selenizada resultante. Empresas acreditadas en la producción de este suplemento proporcionan un porcentaje de selenio unido orgánicamente a la levadura superior al 90%, del cual se estima que más del 80% se encuentra unido a proteínas. Sin embargo, cuando el enriquecimiento de la levadura la realizan otros laboratorios sin tanta experiencia en ese campo, las levaduras pueden presentar un porcentaje de selenito sódico sin biotransformar muy superior, encontrándose de esta forma gran parte del selenio sin incorporar a la levadura, y teniendo así una mezcla de selenito y levadura, con el selenio en forma libre (Rayman *et al.*, 2008). Otro aspecto a destacar es que la *Saccharomyces cerevisiae* interviene en muchos de los procesos fermentativos que tienen lugar para la producción de algunos alimentos, como por ejemplo pan, cerveza, vino, etc. En el siguiente punto se tratarán algunos alimentos que se basan en este proceso.

II.2.2.2. ELABORACIÓN DE ALIMENTOS MEDIANTE PROCESOS DE FERMENTACIÓN

Los microorganismos se ven involucrados con frecuencia en procesos fermentativos, lo cual es ampliamente utilizado para producir alimentos que requieren de esta fermentación, como es el

caso del pan, productos lácteos (kéfir, yogur), bebidas fermentadas (cerveza, vinos y licores) u otros. Este hecho junto a su capacidad para biotransformar a selenio orgánico el selenito durante el proceso de fermentación, hace de ellos una opción muy interesante a la hora de desarrollar alimentos enriquecidos en selenio en los que están involucrados. A continuación se describirán brevemente los procesos de obtención de algunos de estos tipos de alimentos, y que han sido objeto de estudio en el presente trabajo.

Vino y cerveza

El origen de las bebidas fermentadas está estrechamente ligado a la evolución del ser humano, siendo probablemente la miel diluida, también conocida como hidromiel, la primera de este tipo de bebidas. Después aparecieron aquellas derivadas de los cereales, como la cerveza, o de frutas, como la uva en el caso del vino. El consumo de estas bebidas se ha extendido de manera importante desde siglos atrás, por lo que la fermentación de este tipo de alimentos se ha convertido actualmente en una ciencia altamente desarrollada con un importante impacto económico (Hidalgo Togores, 2003). Un consumo moderado de bebidas como el vino y la cerveza favorece el metabolismo de las lipoproteínas además de disminuir la mortalidad por enfermedades cardiovasculares (German, 2000). Las levaduras del género *Saccharomyces* son las elegidas para la elaboración tanto del vino como de la cerveza, las cuales se encargarán de la fermentación alcohólica tradicional transformando los hidratos de carbono a etanol con liberación de dióxido de carbono (Hidalgo Togores, 2003).

Según la Ley de la Viña y el Vino 24/2003, el vino puede definirse como el alimento natural obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, o de mosto de uva (Jefatura del Estado, 2003), y que suele contener normalmente un 10-15% de alcohol. En la elaboración del vino existen dos tipos de fermentaciones, la alcohólica y la maloláctica, siendo la primera de ellas común a vino tinto y blanco, mientras que la segunda se considera una fase de acabado para disminuir su acidez y proporcionar carnosidad al vino,

por lo que su uso suele reducirse a vinos con fuerza y volumen, como los tintos. La diferencia fundamental entre el vino blanco y tinto, además de que uno usa uva blanca y otro uva tinta, es que en la elaboración del blanco, el mosto debe estar limpio, libre de hollejo o cualquier fango existente. En la Figura 3 y 4 se esquematizan las etapas de elaboración de vino blanco y tinto, respectivamente. Para la conservación y elaboración del vino, se emplea SO_2 , que es un compuesto antiséptico, estimulante, selectivo y antioxidante, y su adición se conoce como proceso de sulfitado (Benavent J. L. A., 1999). Normalmente se añade al comienzo de la fermentación por su efecto favorable en la propia actividad de las levaduras vínicas y por su efecto antiséptico ya comentado, y en caso de querer evitar la fermentación maloláctica, se adiciona una dosis mayor con posterioridad (Peynaud, 1996). Cada país legisla las cantidades autorizadas de este aditivo ya que en exceso podría producir olores y sabores no deseados así como una acidez elevada. En España el límite máximo total permitido es de 250 mg/L y 300 mg/L expresado como SO_2 , para vino tinto y blanco, respectivamente, según el Estatuto de la Viña, el Vino y los Alcoholes (Benavent J. L. A., 1999).

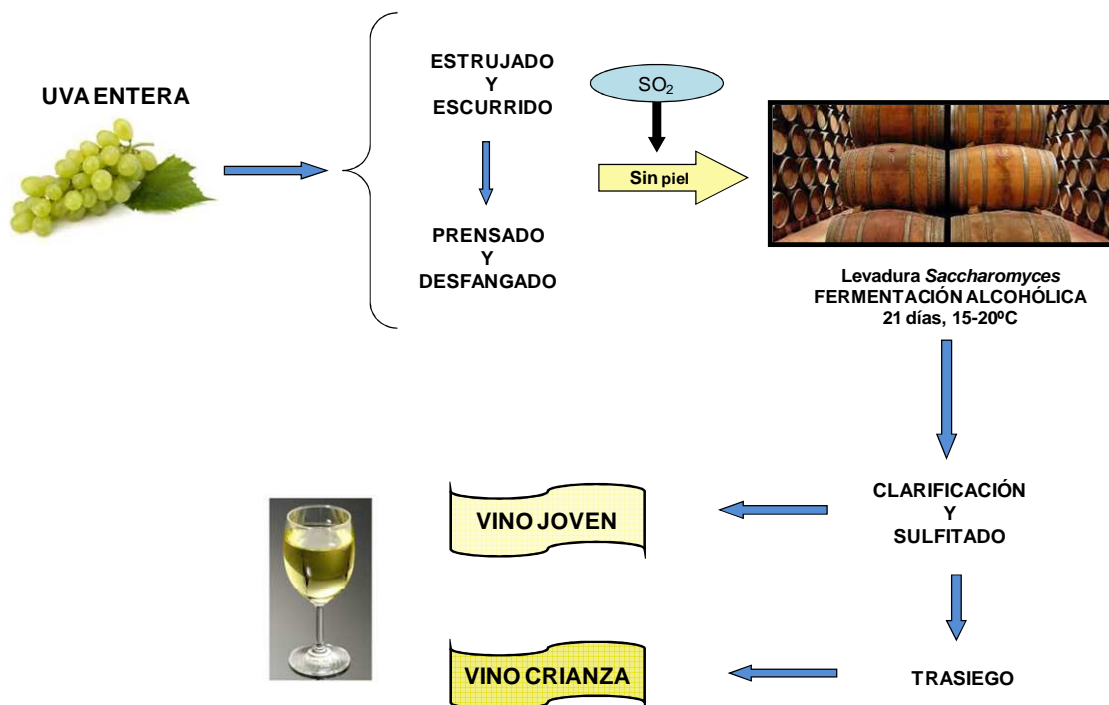


Figura 3. Esquema de la elaboración del vino blanco.

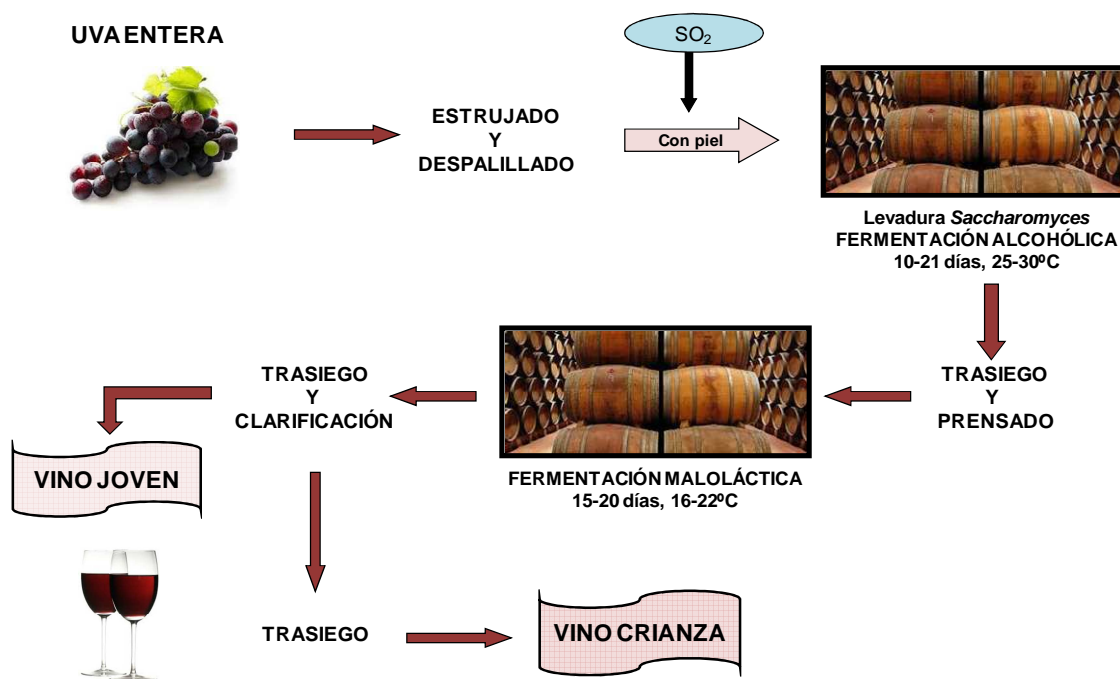


Figura 4. Esquema de elaboración de vino tinto.

En el caso de la cerveza, ésta es una bebida de bajo contenido alcohólico (2-7%), obtenida por fermentación de cereales en presencia de levadura, siendo la cebada el cereal más utilizado para su producción, la cual requiere de un malteado previo. Se pueden añadir también aditivos como el lúpulo para conferirle un sabor más amargo, así como una segunda fuente de hidrato de carbono como maíz, arroz o azúcar (Austin, 1997). La cerveza se puede dividir en dos grandes grupos: la tipo *Ale* o de alta fermentación, producida por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que se sitúa en la parte superior del mosto durante la fermentación; o la tipo *Lager* o de baja fermentación, producida por la levadura *Saccharomyces uvarum*, la cual permanece en el fondo del mosto (Granato *et al.*, 2011). En el proceso de elaboración de la cerveza, mostrado en la Figura 5, tiene lugar una fermentación alcohólica idéntica a la del vino (Austin, 1997).

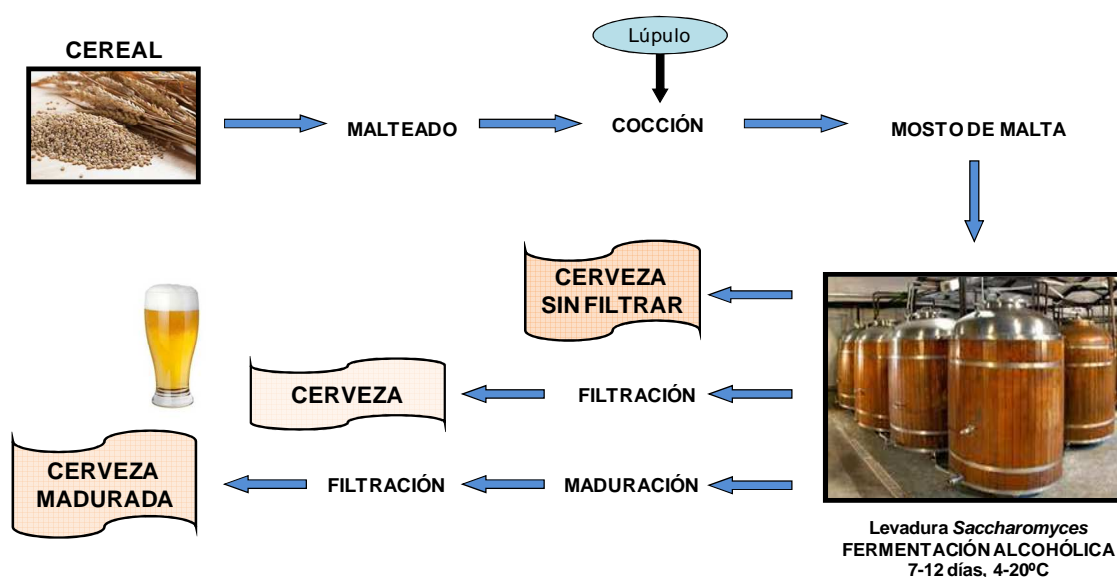


Figura 5. Proceso de elaboración de la cerveza.

Pan

El pan es uno de los alimentos fermentados más antiguos, ya que su producción se remonta a más de 4000 años atrás. Es un alimento consumido en todo el mundo, por lo que se le considera de importancia global. Además, presenta propiedades beneficiosas para la salud debido a su alto contenido en fibra, proteínas, vitaminas, minerales, hidratos de carbono y antioxidantes. Los ingredientes básicos del pan son harina del cereal, agua, sal y levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En función del cereal utilizado para hacer la harina, o de si éste ha sido separado del salvado, pueden obtenerse diferentes tipos de panes (blanco, integral, de centeno, de avena, etc.). La elaboración del pan, mostrada en la Figura 6, requiere de un primer paso de preparación de la masa, seguido de su fermentación, para finalmente proceder a su cocción a elevadas temperaturas (Dewettinck *et al.*, 2008).

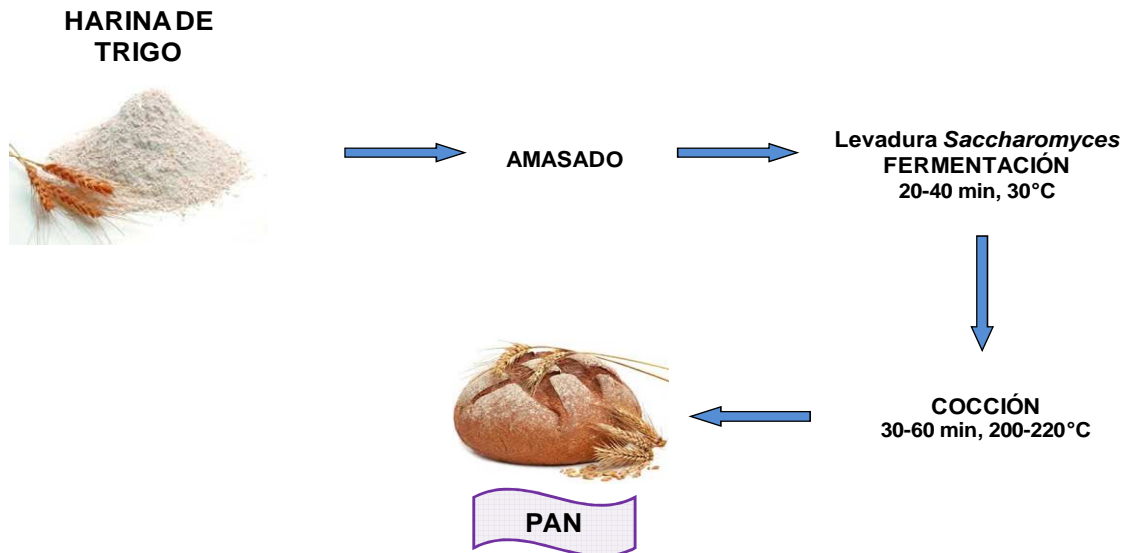


Figura 6. Esquema de elaboración de pan blanco.

Chucrut

El chucrut es un alimento obtenido mediante la fermentación ácido-láctica de la col blanca. Este producto alimenticio es ampliamente consumido en países del Centro y Este de Europa como Polonia o Alemania (Peñas *et al.*, 2010) y presenta importantes propiedades antioxidantes debido a su elevado contenido de vitamina C y compuestos fenólicos, además de altas cantidades de compuestos derivados de glucosinolatos, asociados a propiedades anticancerígenas y antiinflamatorias. Su elaboración es muy sencilla, como se muestra en la Figura 7, y se produce por fermentación natural de la bacteria *Lactobacillus plantarum* de la propia col cortada, en presencia de agua y sal (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2009).

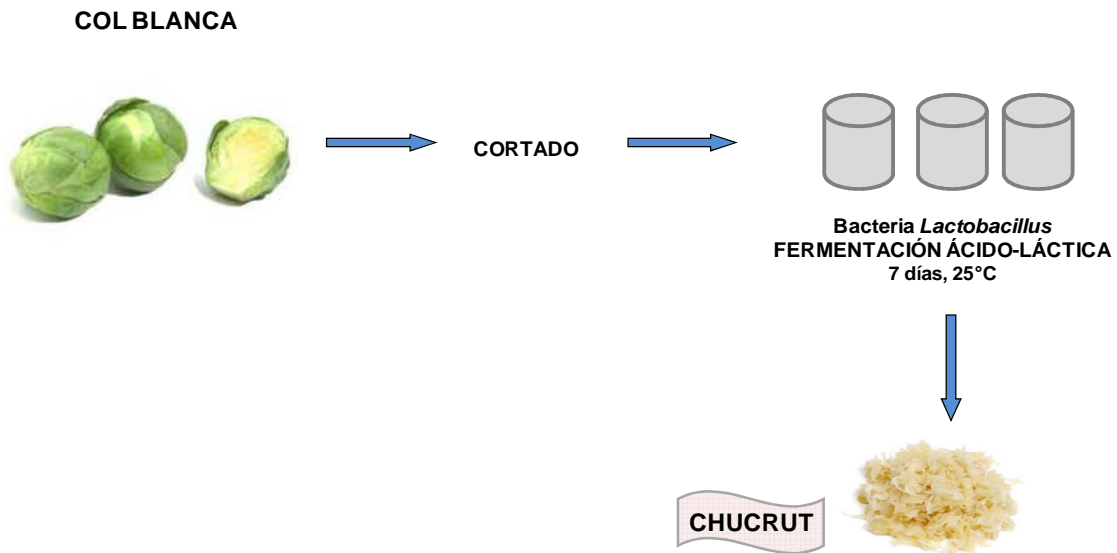


Figura 7. Esquema de elaboración del chucrut.

Yogur

El yogur es uno de los primeros productos probióticos que existieron, y a día de hoy es ampliamente consumido en gran parte del mundo (Hernández, 2003). Para su elaboración se fermenta la leche, a temperatura moderada, mediante la acción de las bacterias *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, y después se enfría para que solidifique (Alzate *et al.*, 2008). En la Figura 8 se muestra un breve esquema de su elaboración. Es un producto lácteo de consistencia suave y homogénea, que se obtiene por fermentación ácido-láctica de leche. Presenta un gran valor nutricional y se le han atribuido propiedades beneficiosas para el alivio de desórdenes estomacales e intestinales (Hernández, 2003), y se ha relacionado con la disminución del colesterol (Akalin *et al.*, 1997).

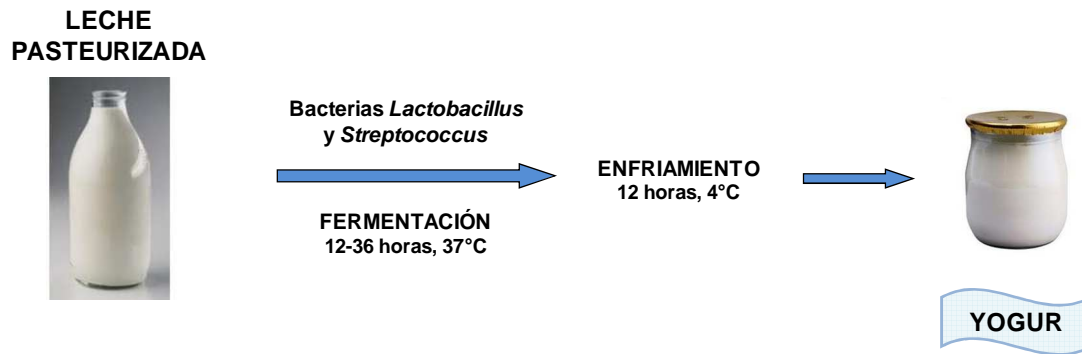


Figura 8. Esquema de elaboración de yogur natural.

II.2.2.3. BIOFORTIFICACIÓN DE CULTIVOS

La biofortificación es uno de los procesos más utilizados para aumentar la ingesta de selenio en la población, y se define como el proceso de incrementar la concentración y/o biodisponibilidad de un elemento esencial en la parte comestible de la planta, ya sea mediante selección genética o intervención agronómica (White *et al.*, 2009). Esto puede conseguirse de varias formas: mediante modificación genética; o aumentando la concentración del elemento de interés bien en el suelo con el uso de fertilizantes enriquecidos, o bien por aplicación directa en las hojas, lo que aumenta la biodisponibilidad de los minerales al mejorar su solubilidad y movilidad. Para que la biofortificación tenga éxito deben superarse unas determinadas barreras para permitir que el mineral traspase la interfase suelo-raíz o rizosfera, se acumule y se redistribuya por la planta obteniendo así una concentración de mineral adecuada sin llegar a ser tóxica en la parte comestible de la misma. Sin embargo, el primer paso para ello es que el suelo contenga una concentración del mineral adecuada (Welch *et al.*, 2005; White *et al.*, 2009).

En muchos países existe una carencia importante del contenido y biodisponibilidad de elementos esenciales, por lo que la biofortificación se ha convertido en una vía de incorporación de éstos a la dieta. Por ejemplo, en países como India, Pakistán, China, Irán y Turquía el nivel de zinc (Zn) es muy bajo y, en este último, se aplicaron fertilizantes enriquecidos en Zn con buenos resultados (Cakmak, 2008). China también ha utilizado fertilizantes con un aporte

adicional de yodo (I) (Jiang *et al.*, 1997), mientras que en la India y el sur de Asia se han llevado a cabo estudios de biofortificación de hierro (Fe) en cultivos de arroz y trigo. Otros elementos como el calcio (Ca) y el magnesio (Mg) también han sido objeto de este tipo de estudios (White *et al.*, 2009).

En cuanto al selenio, Finlandia incorporó en 1984 un sistema de biofortificación de sus cultivos para hacer frente a la deficiencia de este elemento y salvaguardar la salud de su población. La bioaccesibilidad de selenio en el suelo de este país es baja, lo cual se debe tanto a una concentración reducida del elemento en el suelo, un bajo pH del mismo así como a un elevado nivel de Fe en él que reduce su disponibilidad (Aro *et al.*, 1995). Paralelamente se realizó un control del impacto medioambiental de dicha suplementación además del estatus de selenio en la población, sin observarse concentraciones residuales de selenio en lagos u otras áreas de cultivo. De esta manera se aumentó el estatus de selenio en plasma hasta los niveles que se consideran óptimos para una correcta actividad de la selenoenzima GPx (Rayman, 2002).

Las formas de selenio más utilizadas para este tipo de proceso son el selenito y el seleniato, ya que las plantas son capaces de absorberlas con rapidez y biotransformarlas a especies orgánicas fácilmente. En los últimos años se han realizado estudios de biofortificación de selenio en rábanos (Pedrero *et al.*, 2006), brócoli (Pedrero *et al.*, 2007a), trigo (Hart *et al.*, 2011), arroz (Wang *et al.*, 2013), colza (Seppänen *et al.*, 2010) o lentejas (Pedrero *et al.*, 2007b) entre otros ejemplos.

II. CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE SELENIO Y SUS ESPECIES EN MUESTRAS BIOLÓGICAS Y ALIMENTOS

Conocer el contenido total de un elemento en una muestra es importante, sin embargo, es necesario saber además la forma química en que dicho elemento está presente para poder obtener información sobre sus efectos tóxicos o beneficiosos, su metabolismo, biodisponibilidad, comportamiento en el medio ambiente o su función biológica. Según la IUPAC, las diferentes formas químicas o compuestos de un elemento se llaman especies y la distribución de dichas especies en una muestra recibe el nombre de especiación (Templeton *et al.*, 2000). Claros ejemplos de su importancia son el cromo o el arsénico, ya que mientras que el Cr(III) es un elemento esencial, el Cr(VI) es considerado extremadamente tóxico para los organismos (Firdaus *et al.*, 2014) y, de la misma forma, el arsénico inorgánico es mucho más tóxico que el orgánico (Chen *et al.*, 2014). Una vez incorporadas en el organismo, las especies sufren transformaciones químicas que pueden llegar a alterar sus propiedades, por lo que la determinación de las diferentes especies en la ruta metabólica es una herramienta para comprender mejor los mecanismos de absorción celular, transporte, almacenamiento o excreción (Rosen *et al.*, 2004). La especiación de selenio, por lo general, implica un tratamiento de la muestra (extracción, derivatización, preconcentración), la separación de las especies y su posterior identificación y cuantificación, las cuales llevan intrínsecos errores que afectan a la exactitud y veracidad de los resultados.

II.3.1. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

El tratamiento de la muestra es quizá el paso más crítico, largo y laborioso en el análisis de elementos a nivel de traza. Los mayores errores se producen por pérdida y contaminación del analito, lo cual es importante evitar para asegurar un proceso reproducible y eficaz (Cámara *et al.*, 2011). El tratamiento de muestra seleccionado dependerá de la matriz, de las especies esperadas en la misma y de la instrumentación a utilizar (Pedrero *et al.*, 2009).

Durante las etapas previas al análisis (muestreo, almacenamiento y tratamiento de la muestra) pueden ocurrir procesos de volatilización, adsorción en las paredes del recipiente, precipitación, contaminación o transformación de las especies, que pueden modificar tanto el contenido total del elemento como de sus especies. Factores como pH, temperatura de almacenamiento, luz, o presencia de microorganismos, pueden contribuir a ello. Además, las bajas concentraciones de los metales a nivel de trazas en la muestra pueden suponer una fuente de error considerable. Por todo esto, la manipulación de la muestra debe minimizarse al máximo (Lindemann *et al.*, 2000). En la Figura 9 se muestra un esquema de distintas etapas que se pueden llevar a cabo para la determinación del contenido total de selenio y sus especies, objeto de este trabajo.

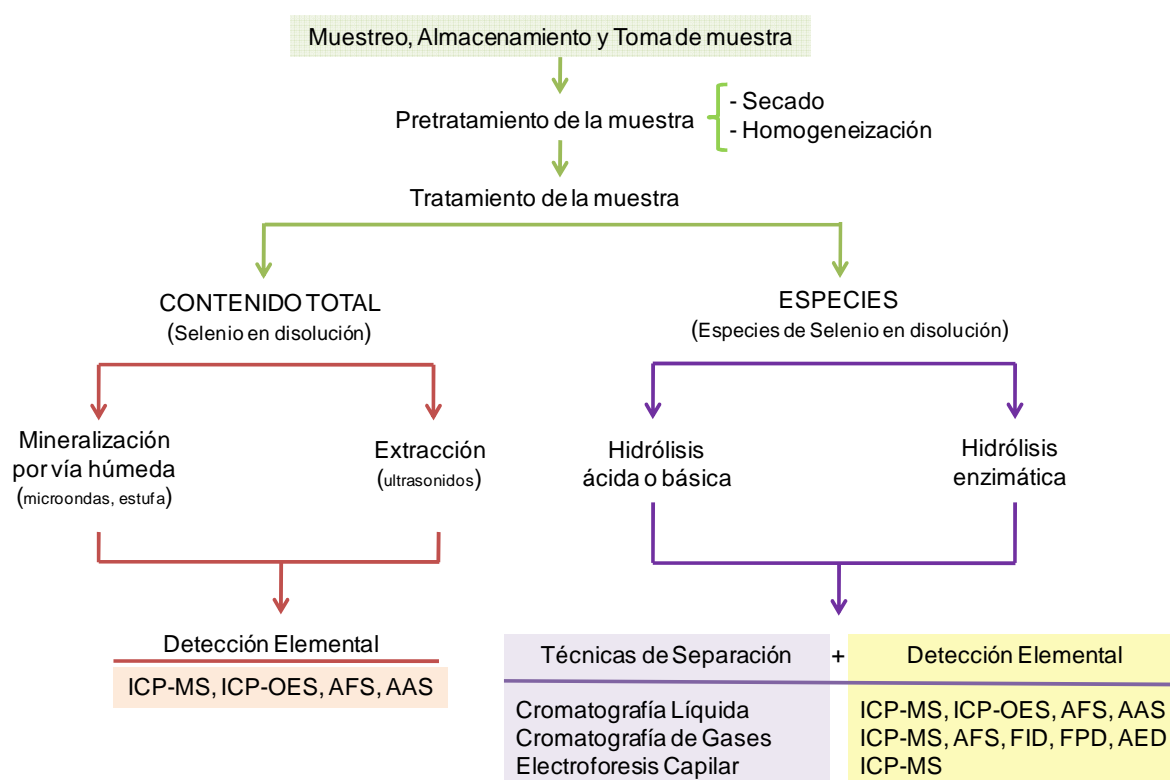


Figura 9. Etapas en la determinación del contenido total de selenio y sus especies.

II.3.1.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE SELENIO

La mayoría de las técnicas instrumentales requieren la destrucción de la materia orgánica presente en la muestra para poder determinar el contenido total de un elemento en la misma. Uno de los métodos más empleados es la mineralización por vía húmeda. Este proceso suele implicar el uso de uno o más reactivos, generalmente ácidos oxidantes (HNO_3 , H_2SO_4 , etc.), o reductores y complejantes (HCl) y, en ocasiones, mezclas con otros agentes oxidantes como es el H_2O_2 , entre otros. Para mejorar el rendimiento de la mineralización suele aplicarse calor mediante placa calefactora, estufa u horno microondas, siendo éste último el más utilizado por las ventajas que ofrece frente a los demás, como son el ahorro de tiempo, reactivos y la alta eficacia del proceso. La mineralización puede llevarse a cabo en recipientes abiertos o cerrados, aunque los recipientes abiertos no son adecuados cuando existen analitos volátiles y, en este caso, se recomienda utilizar recipientes cerrados ya que, además de evitar pérdidas, permiten alcanzar temperaturas y presiones superiores que favorecen la destrucción de la materia orgánica. En ocasiones no es necesario recurrir a tratamientos tan vigorosos para disolver la matriz y puede llevarse a cabo una extracción del analito empleando disolventes menos agresivos, extrayéndose el elemento de la matriz orgánica sin que se produzca su descomposición. Por ejemplo, el uso del microondas para procesos de extracción, con ácidos diluidos se puede aplicar con este fin. El empleo de la energía de ultrasonidos facilita, en este caso, la lixiviación de los metales de matrices sólidas puesto que mejora la disgregación de los sólidos aumentando así la eficacia de la extracción. Los dispositivos más comunes para aplicar la energía de ultrasonidos son la sonda y el baño de ultrasonidos, y se han utilizado en un gran número de trabajos para la extracción de especies de selenio en muestras tales como órganos de pollo (Cabañero *et al.*, 2005b), tejidos vegetales (Peñas *et al.*, 2012, Seppänen *et al.*, 2010) o levadura selenizada (Ruíz Encinar, 2003b). El baño de ultrasonidos aplica la energía de forma indirecta a través de agua contenida en el baño donde se coloca otro recipiente con la muestra y el disolvente. Es un tratamiento menos agresivo que la sonda aunque la potencia alcanzada es también mucho menor. Por otro lado, la sonda de ultrasonidos transmite la energía de forma

directa a la disolución ya que se introduce físicamente en el medio de trabajo, permitiendo amplificar la potencia hasta 100 veces más que en el caso del baño (Priego-Capote *et al.*, 2007).

II.3.1.2. EXTRACCIÓN DE ESPECIES DE SELENIO

La etapa del tratamiento de la muestra para la determinación de especies entraña una gran dificultad, siendo aún más crítico en el caso de análisis a nivel de trazas (Cámara *et al.*, 2011). El método seleccionado debe minimizar las pérdidas o contaminación de la muestra, alcanzar elevados rendimientos de recuperación y además mantener la integridad de las especies a determinar. Concretamente, en las muestras biológicas el selenio suele encontrarse como selenoamino ácidos, incorporados o no a proteínas (Pedrero *et al.*, 2009), y su tratamiento será diferente en función de si quiere analizarse la proteína intacta o extraer los diferentes selenoamino ácidos.

En el caso de que el objetivo sea la determinación de selenoproteínas, éstas deben mantener su integridad durante el tratamiento, lo cual es complicado ya que pueden ocurrir procesos de proteólisis durante el mismo. Esto se produce debido a la liberación de proteasas durante el proceso de extracción que causan la acidificación del medio así como la desnaturalización de las proteínas y ataques proteolíticos a las mismas. Para evitar que esto ocurra es aconsejable utilizar temperaturas bajas (de unos 4°C) donde la actividad de la proteasa es menor, un pH comprendido entre 6 y 8, y la adición de una mezcla inhibidora de proteasas a la disolución (Gravel, 2002). Los tratamientos más comunes conllevan la extracción con agua (Ruíz Encinar *et al.*, 2003b), mezcla de metanol y ácido clorhídrico (Díaz Huerta *et al.*, 2004) o una disolución reguladora (Gravel, 2002; Palomo *et al.*, 2014).

Sin embargo, cuando lo que se pretende es extraer los selenoamino ácidos, los tratamientos más comunes para su extracción son las hidrólisis ácidas (con ácido clorhídrico) o básicas (con hidróxido de tetrametilamonio), y las enzimáticas, siendo estas últimas las más utilizadas debido a que son menos agresivas y se evita la degradación de especies, ya que se realizan en

condiciones moderadas de temperatura y pH (B'Hymer *et al.*, 2006). Las proteasas son enzimas capaces de romper los enlaces peptídicos de manera inespecífica, por lo que son generalmente las mas empleadas. Entre dichas enzimas encontramos la proteinasa K, pepsina, subtilisina, y la más comúnmente utilizada, pronasa E (proteasa XIV aislada de *Streptomyces griseus*). No obstante, existe el inconveniente de que el rendimiento de extracción en algunas matrices es bajo debido a que la enzima no es capaz de hidrolizar completamente los enlaces del analito, por lo que en ocasiones es necesario recurrir a otro tipo de enzimas como la lipasa, capaz de romper enlaces lipídicos, o la amilasa, utilizada para hidrolizar glucógeno y almidón (Cuderman *et al.*, 2010). Por otro lado se encuentra la alcalasa, una proteasa bacteriana alcalina producida por *Bacillus licheniformis* que posee una capacidad de hidrólisis muy superior a la de otras enzimas alcalinas en condiciones de pH moderadas (Aspmo *et al.*, 2005; Kristinsson *et al.*, 2000). También es común el uso de otro tipo de enzimas no proteolíticas como por ejemplo la driselasa, que es un preparado comercial que contiene laminarinasa, xilanasa y celulasa, y que se aplica para la extracción de especies ocluidas en paredes celulares (Casiot *et al.*, 1999; Pedrero *et al.*, 2009). En ocasiones se requiere el uso conjunto de varias de estas enzimas para poder obtener recuperaciones cuantitativas (Peachey *et al.*, 2008; Ruíz Encinar *et al.*, 2003a). Para la extracción de especies de selenio que se encuentran incorporadas a proteínas, la hidrólisis enzimática es una de las más prometedoras, mientras que en el caso de otras especies que no lo están como la SeMeSeCys o la γ -glutamyl-SeMeSeCys (Arteel *et al.*, 2001), su extracción es independiente de si se usa una hidrólisis enzimática o no enzimática (Behne *et al.*, 1998). En la Tabla 1 se recogen algunos ejemplos de tratamientos de extracción de especies de selenio en diferentes matrices biológicas. Otros procedimientos diferentes a la hidrólisis enzimática han sido también utilizado para extraer SeMet con altos rendimientos, como es el caso de la extracción a reflujo con ácido metasulfónico (Goenaga-Infante *et al.*, 2008).

Tabla 2. Algunos ejemplos de muestras tratadas para la extracción de especies de selenio.

Muestra	Especies identificadas	Tratamiento
Levadura	SeMet	Proteasa XIV, H₂O , sonda 2 min ó incubación 24h a 37°C (Pedrero <i>et al.</i> , 2007c). Proteasa XIV + Lipasa , 0.03 M Tris-HCl (pH 7.5) / Driselasa 0.03 M Tris-HCl (pH 7.5) 2 ciclos incubación 20h a 37°C ó extracción asistida por microondas 15 min a 37°C (Peachey <i>et al.</i> , 2008).
Vegetales (<i>Allium sativum</i> y <i>Brassica juncea</i>)	SeMeSeCys, SeMet	0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) ó Proteasa XIV, H ₂ O ó 0.025 M tampón acetato amónico (Montes-Bayón <i>et al.</i> , 2006).
Champiñón	Se(IV), SeCys ₂	H ₂ O, 3h a 37°C, 200 rpm / Pepsina , 0.05 M Tris-HCl (pH 2.1), 20h a 37°C, 200 rpm / Tripsina , 0.1 M tampón fosfato (pH 7.6), 20h a 37°C, 200 rpm (Stefánka <i>et al.</i> , 2001).
Nueces de Brasil	SeMet	Proteinasa K , agitación en oscuridad 20h a 37°C (Vonderheide <i>et al.</i> , 2002).
Harina de trigo Ostra	SeMet, SeCys ₂ SeMet, TMSe	Subtilisina , 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5), 24h a 37°C 2 ciclos (Moreno <i>et al.</i> , 2004).

Algunos compuestos de selenio son susceptibles a la oxidación, como es el caso de la SeCys, SeMet o la SeMeSeCys, ya que el grupo selenol tiene un potencial de ionización inferior al de tiol (Patching *et al.*, 1999). Para prevenir dicha oxidación, suelen adicionarse agentes reductores como el ditioneitol (DTT) o el β -mercaptoetanol (Ruíz Encinar *et al.*, 2003b). Además, la alquilación con iodoacetamida es muy utilizada para la protección de la SeCys en muestras con alto contenido en selenoproteínas (Bierla *et al.*, 2008; Lipiec *et al.*, 2010).

La extracción de especies mediante procedimientos enzimáticos tradicionales implica incubaciones a una temperatura moderada (37°C), pero durante largos períodos de tiempo, de

entre 20 y 48 horas, lo que supone un riesgo para la transformación de especies en la muestra. Para reducir el tiempo de extracción se han aplicado diferentes procedimientos como la energía de ultrasonidos focalizada o la extracción con líquidos presurizados (PLE). La energía de ultrasonidos focalizada supone una reducción importante de tiempo de tratamiento puesto que en intervalos comprendidos entre 15 segundos y 3 minutos puede alcanzarse una extracción total de selenio de matrices biológicas diversas. Además de esto, el empleo de esta técnica permite utilizar pequeñas cantidades de muestra y bajos volúmenes de extractante, aunque hay que tener en cuenta que la mayor agresividad de la energía de ultrasonidos podría suponer un riesgo de transformación de especies (Vale *et al.*, 2010).

Por otro lado, la PLE también se suele utilizar para la extracción de compuestos orgánicos mediante el empleo de un disolvente o mezcla de ellos a elevada presión y/o temperatura, sin llegar a alcanzar un punto crítico (Suchan *et al.*, 2004). Aunque el uso de esta técnica para la extracción de especies de selenio ha sido escaso, se ha aplicado con éxito para la determinación de selenio y otros elementos traza, en materiales de referencia de músculo e hígado de diferentes pescados (Moreda-Piñeiro *et al.*, 2006) y en la extracción de especies solubles en levadura selenizada (Gómez-Ariza *et al.*, 2004).

Como ya se comentó, el procedimiento de extracción de especies dependerá del método de análisis. A pesar de que la cromatografía de líquidos (LC) es el método más habitual para la separación de las especies de selenio, la cromatografía de gases (GC) también se emplea para analizar tanto especies volátiles como volatilizables tras un adecuado proceso de derivatización. Los procedimientos más utilizados para la derivatización de especies de selenio son la adición de piridina y metilcloroformato, seguida de una extracción con cloroformo (Mester *et al.*, 2006), el uso de derivados del N-trifluoroacetil-O-isopropil (Pérez Méndez *et al.*, 2001), o de cianuro de bromo (Wayne *et al.*, 2004).

II.3.2. DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA ACOPLADA A LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO (HPLC-ICP-MS)

La baja concentración del selenio en los alimentos y muestras biológicas, unido a que se encuentra distribuido en diferentes especies, hace necesario disponer de técnicas de elevada sensibilidad para su determinación. Además, la identificación inequívoca y cuantificación de las mismas es una tarea en ocasiones casi imposible debido a ciertas limitaciones como son la transformación de especies durante el tratamiento de muestra o análisis, la falta de patrones, o la imposibilidad para identificar picos cromatográficos (Pedrero *et al.*, 2009). Normalmente, los métodos para la determinación de especies están constituidos por una técnica de separación acoplada a un detector de elevada sensibilidad y especificidad, ya sea molecular o atómico (Lobinski *et al.*, 1998). La detección se realiza generalmente en línea, aunque en algunos casos se procede a recoger fracciones de los compuestos separados y se analizan posteriormente en modo discontinuo.

Los detectores que suelen utilizarse son técnicas espectrométricas y espectroscópicas debido a su alta sensibilidad, selectividad y fácil acoplamiento, entre las que destacan la absorción atómica (AAS), fluorescencia atómica (AFS), la espectrometría de masas (MS), el plasma de acoplamiento inductivo con espectrometría de masas (ICP-MS) o con detección óptica (ICP-OES).

Cuando lo que se busca es obtener información estructural deben utilizarse técnicas de ionización suave como la espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF) o la espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS). Mediante estas técnicas no son necesarios los patrones comerciales por lo que son adecuadas cuando éstos no se pueden conseguir. Sin embargo, su elevado coste y baja sensibilidad limitan su aplicación (Pedrero *et al.*, 2009). En los últimos años, la introducción de analizadores de masas como el Orbitrap, que permiten alcanzar límites de

detección del orden de partes por billón, ha supuesto un impulso importante para que técnicas como el ESI-Orbitrap/MS/MS se incorporen al campo de la especiación y metalómica (Aureli *et al.*, 2012; Bianga *et al.*, 2013). Desafortunadamente, es una técnica costosa, no asequible para la mayoría de los laboratorios.

En cuanto a las técnicas de separación, las más utilizadas son la electroforesis capilar (CE), la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) (Yang *et al.*, 2004a). La CE presenta la capacidad para separar distintos analitos (cationes, aniones, iones metálicos, complejos de metales con ligandos orgánicos, biomacromoléculas) aunque el pequeño diámetro del capilar y los bajos volúmenes de muestra limitan su sensibilidad (B Hymer *et al.*, 2006). Por lo general, las técnicas cromatográficas son las preferidas para este fin. A pesar de que la GC es la más adecuada para analizar especies volátiles o volatilizables de selenio, es necesario un paso de derivatización previo, como se comentó anteriormente, lo que conlleva un tratamiento más tedioso que además puede provocar la descomposición térmica de algunas especies (Yang *et al.*, 2004b).

Actualmente, la técnica más utilizada para la determinación de especies de selenio es HPLC-ICP-MS debido a que muchos de los compuestos de interés de selenio en muestras biológicas son no volátiles, por lo que pueden analizarse en fase líquida evitando derivatizaciones, sumado a la numerosas ventajas que presenta el ICP-MS como son su versatilidad, elevada sensibilidad y su capacidad de detección multielemental.

Acoplamiento HPLC-ICP-MS

El funcionamiento de la técnica ICP-MS, una de las herramientas más poderosas para el análisis elemental, consiste en generar iones elementales en la fuente de plasma a presión atmosférica a partir de los componentes de la muestra, que después son conducidos a un sistema de lentes iónicas, se separan por su relación masa/carga en un analizador de masas a alto vacío y finalmente son detectados. El plasma consiste en un gas altamente ionizado y conductor de la

electricidad, que presenta unas temperaturas entre 5000-10000 K, el cual es generado en una antorcha de cuarzo utilizando como gas plasmógeno un gas inerte (como el argón) mediante la acción de una bobina de radiofrecuencias (García-Alonso *et al.*, 2011).

A pesar de sus ventajas, la determinación de selenio mediante ICP-MS presenta el problema de que sus isótopos mayoritarios (^{80}Se , ^{78}Se) son difíciles de monitorizar debido a la presencia de interferencias espectrales, principalmente de dímeros del gas plasmógeno, o de Kr, una impureza presente en este gas. Uno de los isótopos menos abundantes del selenio, el ^{82}Se , es el más empleado en la determinación de selenio puesto que es el que se encuentra menos interferido (Pedrero *et al.*, 2009). La Tabla 3 refleja las interferencias espectrales más importantes en la determinación de selenio mediante ICP-MS. Estas interferencias pueden ser eliminadas mediante el empleo de celdas de colisión/reacción (cuadrupolos, hexapolos u octopolos) presentes en el propio ICP-MS, las cuales están presurizadas con un gas o mezcla de gases que colisionan y/o reaccionan con las especies poliatómicas interferentes para reducir o eliminar dichas interferencias, posibilitando la monitorización de las especies más abundantes del selenio, lo que es especialmente útil a bajas concentraciones. Normalmente el He se utiliza como gas de colisión mientras que el H_2 , NH_3 , Xe o CH_4 son gases de reacción comunes (Hinojosa Reyes *et al.*, 2003a).

El acoplamiento del sistema HPLC con el ICP-MS requiere que los caudales de trabajo empleados en el HPLC sean compatibles con los nebulizadores convencionales del ICP, del orden de 1 mL/min, y que las fases móviles empleadas tengan un contenido bajo de disolventes orgánicos y sales para adecuarse a las condiciones del plasma (Michalke, 2003).

Tabla 3. Interferencias espectrales en la determinación de selenio mediante ICP-MS.

Isótopo	Abundancia (%)	Interferencias
^{74}Se	0.89	$^{38}\text{Ar}^{36}\text{Ar}^+$, $^{37}\text{Cl}_2^+$, $^{40}\text{Ar}^{34}\text{S}^+$
^{76}Se	9.37	$^{40}\text{Ar}^{36}\text{Ar}^+$, $^{40}\text{Ar}^{36}\text{S}^+$, $^{31}\text{P}^{14}\text{N}^+$
^{77}Se	7.63	$^{40}\text{Ar}^{36}\text{ArH}^+$, $^{38}\text{Ar}_2\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$
^{78}Se	23.77	$^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$, $^{31}\text{P}_2^{16}\text{O}^+$
^{80}Se	49.61	$^{40}\text{Ar}_2^+$, $^{79}\text{BrH}^+$
^{82}Se	8.73	$^{40}\text{Ar}_2\text{H}_2^+$, $^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}_2^+$, $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_3^+$, $^{81}\text{BrH}^+$

Respecto a la separación mediante HPLC, es conveniente utilizar al menos dos técnicas cromatográficas ortogonales (Pedrero *et al.*, 2007a) para permitir una identificación de especies inequívoca, ya que se puede producir la coelución de varias de ellas, lo que hace que la asignación únicamente mediante el tiempo de retención no sea suficiente (Szpunar *et al.*, 2003). Los mecanismos de separación más comúnmente utilizados son la exclusión molecular (SEC), el intercambio iónico (IE) y la fase inversa (RP) con pares iónicos, aunque la cromatografía quiral o de afinidad también se ha empleado en determinados estudios.

La **cromatografía de exclusión molecular** (SEC) se utiliza para la separación de biomoléculas de alto peso molecular como péptidos y proteínas (Aureli *et al.*, 2012; Chan *et al.*, 2012). En este tipo de cromatografía, las moléculas son atrapadas en los poros del relleno donde permanecen más o menos tiempo en función de su tamaño. Las moléculas que son más grandes que el tamaño de poro de la columna quedan fuera del mismo y no son retenidas, por lo que son las primeras en salir (Skoog *et al.*, 2001). A pesar de que la resolución de esta técnica es baja, es

muy utilizada en separaciones multidimensionales como técnica preparativa (Aureli *et al.*, 2012; Chan *et al.*, 2012).

La ***cromatografía de intercambio iónico*** (IE) se basa en la capacidad de los grupos cargados de la fase estacionaria para atraer los iones de signo contrario del soluto. En intercambio aniónico los grupos cargados de la fase estacionaria son positivos, por lo que atraen a los aniones del soluto, mientras que en el intercambio catiónico los puntos cargados negativamente de la fase estacionaria atraen a los cationes (Cubadda *et al.*, 2010).

Finalmente se encuentra la ***cromatografía de fase inversa*** (RP), que con la adición de formadores de pares iónicos como el ácido trifluoroacético (TFA) o el heptafluorobutírico (HFBA) permite separar moléculas neutras, aniónicas y catiónicas (Kotrebai *et al.*, 2000; Ponce de León *et al.*, 2002). Esta técnica requiere en ocasiones el empleo de un gradiente de polaridad para alcanzar elevadas concentraciones de disolventes orgánicos (metanol o acetonitrilo), lo que afecta a la estabilidad del plasma en el ICP-MS y disminuye la sensibilidad, por lo que para su uso es necesario realizar modificaciones como disminuir el caudal a unos 0.1 mL/min (lo que conlleva el empleo de micronebulizadores), eliminar el disolvente por enfriamiento de la cámara de nebulización, o el uso de conos de platino y la adición de oxígeno al gas plasmógeno para usar fases móviles con alto contenido de disolventes orgánicos (Hinojosa Reyes *et al.*, 2006).

El amplio uso de estos mecanismos de separación acoplados a ICP-MS para la determinación de especies de selenio queda registrado en numerosos estudios en distintas matrices biológicas como levaduras selenizadas (Capelo *et al.*, 2004; Pedrero *et al.*, 2007c; Ruíz Encinar *et al.*, 2003b), plantas y vegetales (Cubadda *et al.*, 2010; Peñas *et al.*, 2012; Pedrero *et al.*, 2006) o tejidos biológicos (Bierla *et al.*, 2008; Cabañero *et al.*, 2005b; Schram *et al.*, 2008).

Validación de resultados en especiación

La validación de los resultados obtenidos en especiación requiere del empleo de al menos dos metodologías analíticas independientes, el uso de materiales de referencia o de la realización de estudios de comparación de resultados entre laboratorios (Quevauviller, 2001). Sin embargo, dicha validación es una tarea difícil debido a la escasez de materiales de referencia certificados para especies ya que su separación, identificación y cuantificación es complicada y, además, para que la validación sea correcta es necesario que la matriz del material de referencia sea idéntica o muy similar a la de la muestra, y la concentración de las especies sea del mismo orden.

En los últimos años se han desarrollado varios materiales de referencia, la mayoría de ellos relacionados con la levadura selenizada, como es el caso del material certificado SELM-1 producido por el Instituto de Patrones Nacionales para la Medición (Institute for National Measurement Standards, INMS) del Consejo Nacional de Investigación de Canadá (National Research Council of Canada NRCC) (Mester *et al.*, 2006) con contenidos certificados en selenio total (2059 ± 64 mg/Kg), metionina (5758 ± 277 mg/Kg) y selenometionina (3431 ± 157 mg/Kg). Posteriormente, este mismo organismo, y en un estudio coordinado por el centro LGC Limited de Reino Unido, desarrolló otro material de referencia consistente en levadura selenizada en formato de tabletas (CCQM-P86) con concentraciones de 337.6 ± 9.7 mg/Kg y 561.5 ± 44.3 mg/Kg para selenio y selenometionina, respectivamente (Goenaga-Infante *et al.*, 2008). Las conclusiones del ejercicio de intercomparación que dio lugar a la certificación del material indicaron que los valores de recuperación obtenidos para la SeMet estaban influidos por el procedimiento de extracción empleado. Aquellos laboratorios que emplearon el análisis por dilución isotópica acoplado a ICP-MS, en su modalidad de especies específica, fueron los que proporcionaron mejores resultados, ya que este procedimiento de calibración permite minimizar el efecto que la transformación de especies durante la extracción puede ocasionar en el resultado final. Desafortunadamente, y como se comentará posteriormente, el número de especies de

selenio enriquecidas isotópicamente no es muy elevado. La dilución isotópica acoplada a ICP-MS también fue empleada para la caracterización de otro material de referencia (ERM-BC 210a) consistente en harina de trigo enriquecida en selenio, desarrollado nuevamente por el organismo LGC *Limited*, con unos valores certificados de 17.23 ± 0.91 mg/Kg y 27.4 ± 2.6 mg/Kg para selenio total y selenometionina, respectivamente.

La carencia de materiales de referencia en especiación de selenio, y en especiación en general, se debe fundamentalmente a que la legislación contempla contenidos totales de elementos y no de especies (excepto en el caso del cromo y el mercurio). Una aproximación para la validación de los resultados es llevar a cabo balances de masas, es decir, la suma de las especies individuales con respecto al contenido total de selenio. Sin embargo, en muchos trabajos de investigación no se recogen los datos de balance de masas.

Como se ha comentado anteriormente, el análisis por dilución isotópica se ha convertido en una herramienta analítica imprescindible para la cuantificación de las especies. Es una técnica absoluta que no precisa del uso de materiales de referencia y permite cuantificar las especies mediante la medida directa de las relaciones isotópicas de un elemento en muestra y trazador.

II.3.3. ANÁLISIS POR DILUCIÓN ISOTÓPICA

II.3.3.1. FUNDAMENTO Y VENTAJAS DE LA DILUCIÓN ISOTÓPICA

El análisis por dilución isotópica (IDA) es una técnica analítica basada en la medida de las relaciones isotópicas de un elemento en muestras donde previamente se ha alterado, de manera controlada, su composición isotópica mediante la adición de una cantidad conocida del elemento a determinar enriquecido en un determinado isótopo (trazador o *spike*). Para que esto sea posible, el elemento debe de tener al menos dos isótopos estables o radioactivos de vida media larga que se puedan medir sin interferencias espectrales mediante espectrometría de

masas. Tras adicionar el trazador, debe alcanzarse el equilibrio entre los isótopos naturales de la muestra y el enriquecido, obteniéndose una abundancia isotópica resultante intermedia entre ambas, que dependerá de la cantidad de trazador adicionado así como de la cantidad original del elemento en la muestra. A partir de la medida de la nueva relación isotópica en la mezcla puede determinarse la concentración en la muestra original para un elemento con dos isótopos diferentes **a** y **b**, siendo **a** el isótopo más abundante en la muestra y **b** el isótopo enriquecido en el trazador, utilizando la ecuación de la dilución isotópica (Ecuación 1):

Ecuación 1

$$C_s = C_t \frac{m_t}{m_s} \frac{M_s}{M_t} \frac{A_t^b}{A_s^a} \left(\frac{R_m - R_t}{1 - R_m R_s} \right)$$

donde C_s y C_t son las concentraciones del elemento en la muestra y el trazador, respectivamente; m_s y m_t son la masa tomada de muestra y del trazador añadido, respectivamente; M_s y M_t son el peso atómico del elemento en la muestra y en el trazador, respectivamente; A_s^a y A_t^b son la abundancia del isótopo **a** en la muestra y del isótopo **b** en el trazador, respectivamente; R_m es la relación isotópica en la mezcla y R_s y R_t es la relación isotópica en la muestra y en el trazador, respectivamente. Como puede observarse, todos los parámetros de la ecuación son conocidos, por lo que la concentración del elemento en la muestra puede calcularse simplemente midiendo la relación isotópica en la muestra mediante espectrometría de masas.

Aunque tradicionalmente la espectrometría de masas con fuente de ionización térmica (TIMS) ha sido la técnica utilizada para llevar a cabo IDA con el fin de determinar la concentración total de elementos traza, en los últimos años el ICP-MS la ha ido reemplazando hasta convertirse casi en la técnica exclusiva para ello. Este cambio se ha debido no sólo a la mayor disponibilidad del ICP-MS, sino también a la buena precisión y exactitud en la medida de las relaciones isotópicas,

unido a la sencillez y rapidez de los análisis. Además, la gran facilidad para acoplar técnicas de separación al ICP-MS ha permitido la determinación de compuestos, pudiéndose extender el IDA a la especiación elemental (García-Alonso *et al.*, 2011).

Ventajas de la dilución isotópica

Una de las ventajas que presenta el IDA respecto a otras técnicas de cuantificación, y que además la diferencian de ellas, es que es independiente de la sensibilidad instrumental, puesto que ninguno de los parámetros está relacionado con ella. De este modo, cualquier variación de la sensibilidad por inestabilidades instrumentales, como la deriva de la señal o el efecto matriz, no tendrán influencia en el valor de la concentración del elemento en la muestra. El trazador actúa como el patrón interno más ideal que se pudiese utilizar.

Otra ventaja es que la incertidumbre de la medida de la concentración prácticamente sólo depende de la incertidumbre en la medida de las relaciones R_m , ya que el resto de los parámetros son conocidos, lo cual puede llevarse a cabo con una elevada exactitud y precisión mediante espectrometría de masas.

La ventaja más relevante de la dilución isotópica es que, una vez alcanzado un completo equilibrio entre la muestra y el trazador, cualquier posible pérdida de analito de la mezcla no tendrá influencia en el resultado final. Esto se debe a que cualquier alícuota de la mezcla contendrá la misma R_m y no será necesario conocer los factores de dilución o preconcentración, o tener en cuenta las separaciones no cuantitativas.

Por otro lado, ya que R_m proporciona directamente el valor de C_s , no es necesario recurrir a calibración externa instrumental ni a métodos de adiciones estándar. De esta manera, el uso de esta técnica supone un importante ahorro de tiempo y reactivos en comparación con los procedimientos analíticos clásicos (Rodríguez-González *et al.*, 2005). Por todo lo comentado anteriormente, el análisis por dilución isotópica es considerado el único método de referencia o

absoluto de análisis que puede ser aplicado de forma general en análisis de trazas (García-Alonso *et al.*, 2011).

No obstante, existen una serie de requisitos que se deben cumplir para que todas estas ventajas tengan lugar. Lo primero de todo, hay que tener en cuenta que, antes de que se produzca la completa homogeneización de la muestra y el trazador, cualquier pérdida de analito, ya sea de muestra o de *spike*, supondrá una fuente de error considerable. Por otra parte, una vez alcanzada una completa homogeneización, el isótopo enriquecido añadido a la muestra deberá comportarse de manera idéntica al elemento natural durante todo el procedimiento analítico. Además, la medida de las intensidades de los isótopos **a** y **b** debe estar libre de interferencias espectrales, y los factores que afectan a la exactitud en la medida de las relaciones isotópicas deben corregirse previamente. Finalmente, se requiere un control exhaustivo de los blancos para evitar cualquier tipo de contaminación que pudiese afectar la medida de R_m . Si cualquiera de los citados requisitos no se cumpliera, el valor de R_m introducido en la Ecuación 1 no sería exacto y proporcionaría una concentración del analito errónea (Rodríguez-González *et al.*, 2005).

Factores que afectan a la exactitud de las medidas en IDA

Como ya se ha comentado, deben corregirse una serie de errores sistemáticos a los que está sujeta la medida de las relaciones isotópicas mediante ICP-MS: interferencias espectrales, el tiempo muerto del detector y la discriminación de masas.

La formación de ***interferencias espectrales*** mediante el uso de ICP-MS es un problema en la aplicación de la IDA ya que al menos dos de los isótopos del elemento a analizar deben estar libres de ellas. Como ya se comentó en el apartado III.2., el uso de analizadores de masa con celdas de colisión/reacción permite minimizar al máximo este tipo de interferencias.

Por otro lado, el ***tiempo muerto del detector*** podría definirse como el tiempo que éste necesita para contabilizar la llegada de dos iones como dos eventos diferentes. Esta limitación es

inherente a todo sistema de detección que incluya una detección electrónica y de conteo, como el multiplicador de electrones cuando trabaja en modo digital, que son los más utilizados en los ICP-MS comunes (colector sencillo). Cuando el número de iones que alcanzan el detector es muy alta (dando lugar a más de 10^6 cuentas por segundo), el equipo no tendrá tiempo suficiente para alcanzar el valor umbral que necesita para diferenciar un pulso de otro y registrará menos iones de los que realmente llegan al detector por unidad de tiempo. Mediante el uso de la Ecuación 2, donde T es el tiempo muerto del detector, pueden corregirse las intensidades medidas.

Ecuación 2

$$I_{\text{corregida}} = \frac{I_{\text{medida}}}{1 - I_{\text{medida}} T}$$

Por último, el efecto de ***discriminación de masas*** se debe a una transmisión preferente de los iones más pesados frente a los más ligeros a través de la interfase de extracción y del espectrómetro de masas, y que genera un error sistemático en la media experimental de R_m respecto al valor real o teórico. Utilizando una ecuación de ajuste lineal, potencial o exponencial (García-Alonso *et al.*, 2011) puede corregirse este factor, siendo el ajuste exponencial (Ecuación 3) el utilizado en la determinación de selenio (Hinojosa Reyes *et al.*, 2003a):

Ecuación 3

$$R_{\text{corregida}} = R_{\text{medida}} \exp (K \Delta m)$$

donde K es el factor de discriminación de masas por unidad de masa, Δm la diferencia de masa entre los isótopos de la relación, y $R_{\text{corregida}}$ y R_{medida} son la relación isotópica corregida y medida, respectivamente (García-Alonso *et al.*, 2011).

La obtención de resultados de calidad mediante dilución isotópica requiere además de una correcta caracterización del trazador con respecto a la pureza y la concentración, una homogeneización adecuada entre la muestra y el trazador.

II.3.3.2. ESPECIACIÓN CUANTITATIVA DE SELENIO MEDIANTE DILUCIÓN ISOTÓPICA-ICP-MS

La dilución isotópica también puede ser aplicada a la determinación de especies, ya que en ICP-MS la sensibilidad de un elemento es independiente del compuesto en el que se encuentre y depende únicamente de la cantidad del mismo que se introduzca en el equipo. Gracias a este hecho, la especiación mediante IDA permite la cuantificación de especies de un modo relativamente sencillo y con gran fiabilidad (García-Alonso *et al.*, 2011). Heumann *et al.*, describen dos modos de análisis por dilución isotópica para realizar especiación elemental en función de en qué momento y en qué forma química se adicionase el trazador isotópico a la muestra: modo inespecífico y modo específico (Heumann *et al.*, 1994; Heumann, 2004).

En el modo inespecífico (*species-unspecific mode*) el trazador se adiciona en continuo tras la completa separación de las especies endógenas de la muestra (adición post-columna), por lo que en este caso puede añadirse en una forma química diferente a las presentes en la muestra y se consigue la automatización del proceso. Este modo es especialmente útil y, a veces, la única alternativa cuando no se conoce la estructura y composición de las especies a analizar o cuando las correspondientes especies enriquecidas no se encuentran disponibles comercialmente o no se pueden sintetizar. Sin embargo, no ofrece todas las ventajas de la dilución isotópica ya que la adición del trazador se produce después de la separación y cualquier pérdida producida con anterioridad no será corregida (García-Alonso *et al.*, 2011). La IDA inespecífica ha sido

aplicada con éxito para la determinación de selenio en numerosos estudios, por ejemplo, Kirby *et al.* la utilizaron para determinar SeMet y SeMet oxidada en muestras de harina, trigo y galletas (Kirby *et al.*, 2008) y, del mismo modo, Díaz Huerta lo hizo en el análisis de levadura selenizada (Díaz Huerta *et al.*, 2003). Por otro lado, este modo permitió la cuantificación de las selenoproteínas glutatión peroxidasa, selenoproteína P y albúmina en suero humano mediante un trazador de ^{77}Se (Hinojosa *et al.*, 2003b). También se ha aplicado con buenos resultados en el análisis de otros elementos, como es el caso de la determinación de aductos de cis-platino en ADN utilizando ^{194}Pt (García-Sar *et al.*, 2009) o de transferrina en suero humano con ^{57}Fe (Del Castillo Busto *et al.*, 2006).

En cuanto al modo específico (*species-unspecific mode*), el trazador utilizado debe contener las especies a analizar marcadas isotópicamente, por lo que debe conocerse su estructura y composición para adquirirlas comercialmente o sintetizarlas. En este caso, las especies enriquecidas se adicionan al principio del proceso analítico y, tras alcanzar la completa homogeneización, se pueden aprovechar todas las ventajas que ofrece la dilución isotópica convencional. Para la determinación simultánea de varias especies en una muestra pueden utilizarse trazadores enriquecidos en distintos isótopos del mismo elemento, lo que además permitiría corregir posibles interconversiones entre las propias especies a lo largo del proceso (García-Alonso *et al.*, 2011). Este hecho ha sido utilizado para la corrección de la conversión de SeMet a SeMet oxidada en muestras de levadura selenizada (Hinojosa Reyes *et al.*, 2004; Pedrero *et al.*, 2007c), así como a la determinación de otros elementos como el hierro (Del Castillo Busto *et al.*, 2006), platino (García-Sar *et al.*, 2009), mercurio, cromo o estaño (Rodríguez-González *et al.*, 2005).

Uno de los problemas que presenta el análisis por dilución isotópica en modo de especies específica, es que no existen comercialmente todas las especies de selenio marcadas isotópicamente y, si existen, suelen ser costosas debido a que su síntesis requiere del empleo de procesos de síntesis química, complicados y laboriosos, no asequibles para la mayoría de los laboratorios dedicados a la especiación (Otha *et al.*, 2011). Por todo ello, en la actualidad hay un

gran interés en el desarrollo de procesos de síntesis de trazadores basados en procesos sencillos. A modo de ejemplo, Pedrero *et al.* (2007b) llevaron a cabo la síntesis de ^{77}Se -selenometionina oxidada mediante incubación de la levadura en presencia de ^{77}Se -selenito. La $^{77}\text{SeMet}$ resultante fue aislada mediante HPLC-ICP-MS y, posteriormente, oxidada con peróxido de hidrógeno a ^{77}Se -selenometionina oxidada.

El empleo de trazadores estables no solamente posee interés para la determinación cuantitativa de especies de selenio mediante análisis por dilución isotópica, sino que constituyen una poderosa herramienta analítica, en combinación con el ICP-MS, para establecer el metabolismo de especies de selenio. Así por ejemplo, Suzuki *et al.* (2013) estudiaron el metabolismo del selenio y su excreción en ratas después de haberles sido suministrada $^{82}\text{SeMet}$. Un estudio similar fue llevado a cabo por Gammelgaard *et al.* (2012), pero en este caso en humanos a los que se suministró $^{82}\text{SeMet}$. Por otro lado, Kápolna *et al.* (2012), evaluaron el metabolismo del selenio en cebollas y zanahorias mediante la aplicación foliar de $^{77}\text{selenito}$ y $^{77}\text{seleniato}$, mediante el posterior análisis de los ^{77}Se -metabolitos resultantes por HPLC-ICP-MS.

II. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

III. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdulah R., Miyazaki K., Nakazawa M. & Koyama H. (2005). Chemical forms of selenium for cancer prevention. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19: 141-150.

AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). (2011). Evaluación nutricional de la dieta española. II. Micronutrientes. *Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (ENIDE)*. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, AESAN, España.

Ahsan U., Kamran Z., Raza I., Ahmad S., Babar W., Riaz M. H. & Iqbal Z. (2014). Role of selenium in male reproduction-A review. *Animal Reproduction Science*, 146: 55-62.

Akalin A. S., Gönc S. & Düzel S. (1997). Influence of yogurt and acidophilus yogurt on serum cholesterol levels in mice. *Journal of Dairy Science*, 80: 2721-2725.

Alzate A., Fernández-Fernández A., Pérez-Conde C., Gutiérrez A. M. & Cámara C. (2008). Comparison of biotransformation of inorganic selenium by *Lactobacillus* and *Saccharomyces* in lactic fermentation process of yogurt and kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 8728-8736.

American Dietetic Association. (1999). Position of the American Dietetic Association: functional foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 99: 1278-1285.

Arai S. (1996). Studies on functional foods in Japan – state of the art. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60: 9-15.

Arnér E. S. J. (2010). Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Experimental Cell Research*, 316: 1296-1303.

Aro A., Alfthan G. & Varo P. (1995). Effects of supplementation of fertilizers on human selenium status in Finland. *Analyst*, 120: 841-843.

Arteel G. E. & Sies H. (2001). The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10: 153-158.

- Artursson P., Palm K. & Luthman K. (2012). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64: 280-289.
- Aspmo S. I., Horn A. J. & Eijsink G. H. (2005). Enzymatic hydrolysis of atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochemistry*, 40: 1957-1966.
- Aureli F., Ouerdane L., Bierla K., Szpunar J., Prakash N. T. & Cubadda F. (2012). Identification of selenosugars and other low-molecular weight selenium metabolites in high-selenium cereal crops. *Metallomics*, 4: 968-978.
- Austin G. T. (1997). Fermentación industrial. En: *Manual de procesos químicos en la industria 5ª Edición*. (Ed.), pp 677-704. McGraw Hill, México.
- Ballihaut G., Kilpatrick L. E. & Davis W. C. (2011). Detection, identification and quantification of selenoproteins in a candidate human plasma standard reference material. *Analytical Chemistry*, 83: 8667-8674.
- Barrington J. W., Taylor M., Smith S., Bowen-Simpkins P. (1997). Selenium and recurrent miscarriage. *Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 17: 199-200.
- Bates C.J., Thane C. W., Prentice A. & Delves H. T. (2002). Selenium status and its correlates in a British national diet and nutrition survey: people aged 65 years old and over. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 16: 1-8.
- Beck M. A., Handy J & Levander O. A. (2004). Host nutritional status: the neglected virulence factor. *Trends in Microbiology*, 12: 417-423.
- Beckett G. J. & Arthur J. R. (2005). Selenium and endocrine systems. *Journal of Endocrinology*, 184: 455-465.
- Behne D., Hammel C., Pfeifer H., Röthlein D., Gessner H. & Kyriakopoulos A. (1998). Speciation of selenium in the mammalian organism. *Analyst*, 123: 871-873.

- Behne D., Kyriakopoulos A., Kalcklösch M., Weiss-Nowak C. Pfeifer H., Gessner H. & Hammel C. (1997). Two new selenoproteins found in the prostatic glandular epithelium and in the spermatid nuclei. *Biomedical and Environmental Sciences*, 10: 340-345.
- Benavent J. L. A. (1999). El sulfitado. En: *Manual de enología práctica*. (Ed.), pp 71-85. U.P.M. Instituto de Ciencias de la Educación, España.
- B'Hymer C. & Caruso J. A. (2006). Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1114: 1-20.
- Bianga J., Govasmark E. & Szpunar J. (2013). Characterization of selenium incorporation into wheat proteins by two-dimensional gel electrophoresis-laser ablation ICP-MS followed by capillary HPLC-ICP-MS and electrospray linear trap quadrupole Orbitrap MS. *Analytical Chemistry*, 85: 2037-2043.
- Bierla K., Dernovics M., Vacchina V., Szpunar J., Bertin G. & Lobinski R. (2008). Determination of selenocysteine and selenomethionine in edible animal tissues by 2D size-exclusion reversed-phase HPLC-ICP-MS following carbamidomethylation and proteolytic extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390: 1789-1798.
- Brinkman M., Buntinx F., Muls E. & Zeegers M. P. (2006). Use of selenium in chemoprevention of bladder cancer. *Lancet Oncology*, 7: 766-774.
- Burbano X., Miguel-Burbano M. J., McCollister K., Zhang G., Rodríguez A., Ruíz P., Lecusay R. & Shor-Posner G. (2002). Impact of a selenium chemoprevention clinical trial on hospital admission of HIV-infected participants. *HIV Clinical Trials*, 3: 483-491.
- Burk R. F., Hill K. E. & Motley A. K. (2003). Selenoprotein metabolism and function: Evidence for more than one function for selenoprotein P. *Journal of Nutrition*, 133: 1517S-1520S.
- Cabañero A. I., Carvalho C., Madrid Y., Batoréu C. & Cámara C. (2005a). Quantification and speciation of mercury and selenium in fish samples of high consumption in Spain and Portugal. *Biological Trace Element Research*, 103: 17-35.

- Cabañero A. I., Madrid Y. & Cámara C. (2004). Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an in vitro digestion method. *Analytica Chimica Acta*, 526: 51-61.
- Cabañero A. I., Madrid Y. & Cámara C. (2005b). Enzymatic probe sonication extraction of Se in animal-based food samples: a new perspective on sample preparation for total and Se speciation analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381: 373-379.
- Cakmak I. (2008). Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification? *Plant Soil*, 302: 1-17.
- Cámara C. & Pérez-Conde C. (2011). Análisis de trazas. En: *Análisis químico de trazas*. Cámara, C. & Pérez-Conde, C. (Eds.), , pp. 20-69. Editorial Síntesis S.A., España.
- Capelo J. L., Ximénez-Embún P., Madrid-Albarrán Y. & Cámara C. (2004). Enzymatic probe sonication: Enhancement of protease-catalyzed hydrolysis of selenium bound to proteins in yeast. *Analytical Chemistry*, 76: 233-237.
- Casiot C., Szpunar J., Lobinski R. & Potin-Gautier M. (1999). Sample preparation and HPLC separation approaches to speciation analysis of selenium in yeast by ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14: 645-650.
- Chan Q. & Caruso J. A. (2012). A metallomics approach discovers selenium-containing proteins in selenium-enriched soybean. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403: 1311-1321.
- Chen M., Ma L. & Chen X. (2014). New procedures for arsenic speciation: A review. *Talanta*, 125: 78-86.
- Chu F., Doroshov J. H. & Esworthy R. S. (1993). Expression, characterization and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *The Journal of Biological Chemistry*, 268: 2571-2576.

Clark L. C., Combs G. F. Jr., Turnbull B. W., Slate E. H., Chalker D. K., Chow J., Davis L. S., Glover R. A., Graham G. F., Gross E. G., Krongrad A., Leshner J. L. Jr., Park H. K., Sanders B. B. Jr., Smith C. L. & Taylor J. R. (1996). Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *Journal of the American Medical Association*, 276: 1957-1963.

Combs G. F. Jr. (2001). Selenium in global food systems. *British Journal of Nutrition*, 85: 517-547.

Comisión Europea, Comité Científico para la Alimentación Humana. (2000). *Opinion of the Scientific Committee on Food on the tolerable upper intake level of selenium*. Comisión de las Comunidades Europeas, Bruselas..

Commite on Opportunities in the Nutrition and Food Sciences. (1994). Enhancing the food supply. En: *Opportunities in the Nutrition and Food Sciences: Research Challenges and the Next Generation of Investigators*. Thomas P. R. & Earl R. (Eds.), pp 98-142. The National Academies Press, Estados Unidos.

Cubadda F., Aureli F., Ciardullo S., D'Amato M., Raggi A., Acharya R., Reddy R. A. V. & Prakash N. T. (2010). Changes in selenium speciation associated with increasing tissue concentrations of selenium in wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 2295-2301.

Cuderman P., Ozbolt L., Kreft I. & Stibilj V. (2010). Extraction of Se species in buckwheat sprouts grown from seeds soaked in various Se solutions. *Food Chemistry*, 123: 941-948.

Del Castillo Busto M., Montes-Bayón M. & Sanz-Medel A. (2006). Accurate determination of human serum transferrin isoforms: Exploring metal-specific isotope dilution analysis as a quantitative proteomic tool. *Analytical Chemistry*, 78: 8218-8226.

Dewettinck K., Van Bockstaele F., Kühne B., Van de Walle D., Courtens T. M. & Gellynck X. (2008). Nutritional value of bread: Influence of processing, food interaction and consumer perception. *Journal of Cereal Science*, 48: 243-257.

Díaz Huerta V., Fernández-Sánchez M. L. & Sanz-Medel A. (2004). Quantitative selenium speciation in cod muscle by isotope dilution ICP-MS with a reaction cell: comparison of different reported extraction procedures. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19: 644-648.

Díaz Huerta V., Hinojosa Reyes L., Marchante-Gayón J. M., Fernández-Fernández M. L. & Sanz-Medel A. (2003). Total determination and quantitative speciation analysis of selenium in yeast and wheat flour by isotope dilution analysis ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18: 1243-1247.

Downs K. M., Hess J. B. & Bilgili S. F. (2000). Selenium source effect on broiler carcass characteristics, meat quality and drip loss. *Journal of Applied Animal Research*, 18: 61-71.

Dumont E., Vanhaecke F. & Cornelis R. (2006). Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 1304-1323.

Dunffield-Lillico A. J., Reid M. E., Turnbull B. W., Combs G. F. Jr., Slate E. H., Fischbach L. A., Marshall J. R. & Clark L. C. (2002). Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: A summary report of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 11: 630-639.

Dunffield-Lillico A. J., Dalkin B. L., Reid M. E., Turnbull B. W., Slate E. H., Jacobs E. T., Marshall J. R. & Clark L. C. (2003). Selenium supplementation, baseline plasma selenium status and incidence of prostate cancer: an analysis of the complete treatment period of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 91: 608-612.

- FDA (Food and Drug Administration). (2001). *Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000080*. U. S. Food and Drug Administration. FDA, Estados Unidos.
- Finley J. W. & Penland J. G. (1998). Adequacy or deprivation of dietary selenium in healthy men: clinical and psychological findings. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 11: 11-27.
- Firdaus M. L., Alwi W., Trinoveldi F., Rahayu I., Rahmidar L. & Warsito K. (2014). Determination of chromium and iron using digital image-based colorimetry. *Procedia Environmental Sciences*, 20: 298-304.
- Forceville X. (2007). Effects of high doses of selenium, as sodium selenite, in septic shock patients a placebo-controlled, randomized, double-blind, multi-center phase II study – selenium and sepsis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21: 62-65.
- Gallegos A., Berggren M., Gasdaska J. R. & Powis G. (1997). Mechanisms of the regulation of thioredoxin reductase in cancer cells by the chemopreventive agent selenium. *Cancer Research*, 57: 4965-4970.
- Gammelgaard B., Sturup S. & Vinther C. M. (2012). Human urinary excretion and metabolism of ⁸²Se-enriched selenite and selenate determined by LC-ICP-MS. *Metallomics*, 4: 149–155.
- García-Alonso J. I. & Rodríguez P. (2011). La dilución isotópica en el análisis de trazas. En: *Análisis químico de trazas*. Cámara, C., & Pérez-Conde, C. (Eds.), , pp. 223-278. Editorial Síntesis S.A., España.
- García-Sar D., Montes-Bayón M., Blanco González E., Sierra L. M., Aguado L., Comendador M. A., Koellensperger G., Hann S. & Sanz-Medel A. (2009). Quantitative profiling of in vivo generated cisplatin DNA adducts using different isotope dilution strategies. *Analytical Chemistry*, 81: 9553-9560.
- Garvin D. F., Hareland G., Gregoire B. R. & Finley J. W. (2011). Impact of wheat grain selenium content variation on milling and bread baking. *Cereal Chemistry*, 88: 195-200.

German J. B. (2000). The health benefits of wine. *Annual Review of Nutrition*, 20: 561-593.

Glahn, R. P., Wien, E. M., Van Campen, D. R. & Miller, D. D. (1996). *Caco-2 cell iron uptake from meat and casein digests parallels in vivo studies: Use of a novel in vitro method for rapid estimation of iron bioavailability*. *Journal of Nutrition*, 126: 332-339.

Goenaga Infante H., O'Connor G., Rayman M., Hearn R. & Cook K. (2006). Simultaneous identification of selenium containing species in selenized yeast by on-line HPLC with ICP-MS and electrospray ionization quadrupole time of flight (QTOF)-MS/MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21: 1256-1263.

Goenaga-Infante H., Sturgeon R., Turner J., Hearn R., Sargent M., Maxwell P., Yang L., Barzev A., Pedrero Z., Cámara C., Díaz-Huerta V., Fernández-Sánchez M. L., Sanz-Medel A., Emese K., Fodor P., Wolf W., Goldschmidt R., Vacchina V., Szpunar J., Valiente L., Huertas R., Labarraque G., Davis C., Zeisler R., Turk G., Rizzio E., Mackay L. G., Myors R. B., Saxby D. L., Askew S., Chao W. & Jun W. (2008). Total selenium and selenomethionine in pharmaceutical yeast tablets: assessment of the state of the art of measurement capabilities through international intercomparison CCQM-P86. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390: 629-642.

Gómez-Ariza J. L., Caro de la Torre M. A., Giráldez I. & Morales E. (2004). Speciation analysis of selenium compounds in yeasts using pressurised liquid extraction and liquid chromatography-microwave-assisted digestion-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 524: 305-314.

Granato D., Favalli Branco G., Fonseca Faria J. & Gome Cruz A. (2011). Characterization of brazilian lager and Brown ale beers based on color, phenolic compounds and antioxidant activity using chemometrics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91: 563-571.

- Gravel P. (2002). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using carrier ampholyte pH gradients in the first dimension. En: *The Protein Protocols Handbook (2nd Edition)*. Walker J. M. (Ed.), pp 41-44. Humana Press, Estados Unidos.
- Gregory J., Lowes S., Bates C. J., Prentice A., Jackson L. V., Smithers G., Wenlock R. & Farron M. (2000). *National Diet and Nutrition Survey: Young people aged 4 to 18 years. Vol. 1. Report of the Diet and Nutritional Survey*. The Stationery Office, Reino Unido.
- Hapuarachchi S., Swearingen J. & Chasteen T. G. (2004). Determination of elemental and precipitated selenium, production by a facultative anaerobe grown under sequential anaerobic/aerobic conditions. *Process Biochemistry*, 39:1607-1913.
- Hart D. J., Fairweather-Tait S. J., Broadley M. R., Dickinson S. J., Foot I., Knott P., McGrath S. P., Mowat H., Norman K., Scott P. R., Stroud J. L., Tucker M., White P. J., Zhao F. J. & Hurst R. (2011). Selenium concentration and speciation in biofortified flour and bread: Retention of selenium during grain biofortification, processing and production of Se-enriched food. *Food Chemistry*, 126: 1771-1778.
- Hasegawa T., Mihara M., Nakamuro K. & Sayato Y. (1996). Mechanisms of selenium methylation and toxicity in mice treated with selenocysteine. *Archives of toxicology*, 71: 31-38.
- Hasler C. M. (2002). Functional foods: Benefits, concerns and challenges – A position paper from the American Council on Science and Health. *The Journal of Nutrition*, 132: 3772-3781.
- Hatfield D. L., Tsuji P. A., Carlson B. A. & Gladyshev V. N. (2014). Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health and development. *Trends in Biochemical Sciences*, 39: 112-120.
- Hawkes W. C. & Turek P. J. (2001). Effects of dietary selenium on sperm motility in healthy men. *Journal of Andrology*, 22: 764-772.
- He Q. & Yao K. (2010). Microbial reduction of selenium oxyanions by *Anaeromyxobacter dehalogenans*. *Bioresource Technology*, 101:3760-3764.

- Hernández A. (2003). Los Productos Lácteos. En: *Microbiología Industrial* (Ed.), pp 63-87. Editorial UNED, Costa Rica.
- Heumann K. G. (2004). Isotope dilution ICP-MS for trace element determination and speciation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378: 318-329.
- Heumann K. G., Rottmann L. & Vogl J. (1994). Elemental speciation with liquid chromatography-inductively coupled plasma isotope dilution mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 9: 1351-1355.
- Hidalgo Togores J. (2003). Transformaciones microbianas. Levaduras, bacterias y virus. En: *Tratado de Enología, Tomo I* (Ed.), pp 477-577. Ediciones Mundi-Prensa, España.
- Hinojosa Reyes L., Marchante-Gayón J. M., García Alonso J. I. & Sanz-Medel A. (2003a). Determination of selenium in biological material by isotope dilution analysis with an octapole reaction system ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18: 11-16.
- Hinojosa Reyes L., Marchante-Gayón J. M., García Alonso J. I. & Sanz-Medel A. (2003b). Quantitative speciation of selenium in human serum by affinity chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18: 1210-1216.
- Hinojosa Reyes L., Moreno Sanz F., Herrero Espílez P., Marchante-Gayón J. M., García Alonso J. I. & Sanz-Medel A. (2004). Biosynthesis of isotopically enriched selenomethionine: application to its accurate determination in selenium-enriched yeast by isotope dilution analysis-HPLC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19: 1230-1235.
- Hinojosa Reyes L., Ruíz Encinar J., Marchante-Gayón J. M., García Alonso J. I. & Sanz-Medel A. (2006). Selenium bioaccessibility assessment in selenized yeast after “in vitro” gastrointestinal digestion using two-dimensional chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1110: 108-116.

Hurd D. L. & Kipling J.J. (1964). *Origin and growth of physical science, Part 2*. Penguin Books, Reino Unido.

International Life Sciences Institute. (1999). Safety assessment and potential health benefits of food components based on selected scientific criteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39: 203-316.

Irons R., Tsuji P. A., Carlson B. A., Ouyang P., Yoo M., Xu X., Hatfield D. L., Gladyshev V. N. & Davis C. D. (2010). Deficiency in the 15-kDa selenoprotein inhibits tumorigenicity and metastasis of colon cancer cells. *Cancer Prevention Research*, 3: 630-639.

Jefatura del Estado. (2003). *Ley 24/2003 de 10 de Julio de la Viña y el Vino*. Gobierno de España, España.

Jiang X. M., Cao X. Y., Jiang J. Y., Tai M., James D. W., Rakeman M. A., Dou Z. H., Mamette M., Amette K., Zhang M. L. & Delong G. R. (1997). Dynamics of environmental supplementation of iodine: four years' experience in iodination of irrigation water in Hotien, Xinjian, China. *Archives of Environmental Health*, 52: 399-408.

Kápolna E., Laursen K. H., Erik H. & Larsen E. H. (2012). Biofortification and isotopic labelling of Se metabolites in onions and carrots following foliar application of Se and ⁷⁷Se. *Food Chemistry*, 133: 650–657.

Kirby J. K., Lyons G. H. & Karkkainen M. P. (2008). Selenium speciation and bioavailability in biofortified products using species-unspecific isotope dilution and reversed phase ion pairing-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56: 1772-1779.

Kobayashi Y., Ogra Y. & Suzuki K. T. (2001). Speciation and metabolism of selenium injected with ⁸²Se-enriched selenite and selenate in rats. *Journal of Chromatography B*, 760: 73-81.

- Kotrebai M., Birringer M., Tyson J. F., Block E. & Uden P. C. (2000). Selenium speciation in enriched and natural sample by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS with perfluorinated carboxylic acid ion-pairing agents. *Analyst*, 125: 71-78.
- Kristinsson H. G. & Rasco B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40: 43-81.
- Kyriakopoulos A., Bertelsman H., Graebert A., Hoppe B., Kühbacher M. & Behne D. (2002). Distribution of an 18 kDa-selenoprotein in several tissues of the rat. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 16: 57-62.
- Ledesma M. C., Jung-Hynes B., Schmit T. L. Kumar R., Mukhtar H. & Ahmad N. (2011). Selenium and vitamin E for prostate cancer: post-SELECT (Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial) status. *Molecular Medicine*, 17: 134-143.
- Lindemann T., Prange A., Dannecker W. & Neidhart B. (2000). Stability studies of arsenic, selenium, antimony and tellurium species in water, urine, fish and soil extracts using HPLC/ICP-MS. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 368: 214-220.
- Lipiec E., Siara G., Bierla K., Ouerdane L. & Szpunar J. (2010). Determination of selenomethionine, selenocysteine and inorganic selenium in eggs by HPLC-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397: 731-741.
- Litov R. E. & Combs G. F. Jr. (1991). Selenium in pediatric nutrition. *Pediatrics*, 87: 339-351.
- Lobinski R., Rodríguez Pereiro I., Chassaigne H., Wasik A. & Szpunar J. (1998). Elemental speciation and coupled techniques-towards faster and reliable analyses. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 13: 859-867.
- Lodemann U., Einspanier R., Scharfen F., Martens H. & Bondzio A. (2013). Effects of zinc on epithelial barrier properties and viability in a human and a porcine intestinal cell culture model. *Toxicology in Vitro*, 27: 834-843.

- López-Heras I., Palomo M. & Madrid Y. (2011). Selenoproteins: the key factor in selenium essentiality. State of the art analytical techniques for selenoprotein studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400: 1717–1727.
- Lorentzen M., Maage A. & Julshamm K. (1994). Effects of dietary selenite or selenomethionine on tissue selenium levels of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 121: 359-367.
- MacFarquhar J. K., Broussard D. L., Melstrom P., Hutchinson R., Wolkin A., Martin C., Burk R. F., Dunn J. R., Green A. L., Hammond R., Schaffner W. & Jones T. F. (2010). Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement. *Archives of Internal Medicine*, 170: 256-261.
- Marcocci C., Kahaly G. J., Krassas G. E., Bartalena L, Prummel M., Stahl M., Altea M. A., Nardi M., Pitz S., Boboridis K., Sivelli P., Von-Arx G., Mourits M. P., Baldeschi L., Bencivelli W. & Wiersinga W. (2011). Selenium and the course of mild Graves' orbitopathy. *The New England Journal of Medicine*, 364: 1920-1931.
- Martínez-Villaluenga C., Peñas E., Frías J., Ciska E., Honke J, Piskula M. K., Kozłowska H. & Vidal-Valverde C. (2009). Influence of fermentation conditions on glucosinolates, ascorbigen and ascorbic acid content in White cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* cv. Taler) cultivated in different seasons. *Journal of Food Science*, 74: C62-67.
- Mester Z., Willie S., Yang L., Sturgeon R., Caruso J. A., Fernández M. L., Fodor P., Goldschmidt R. J., Goenaga-Infante H., Lobinski R., Maxwell P., McSheehy S., Polatajko A., Sadi B. B. M., Sanz-Medel A., Criver C., Szpunar J, Wahlen R. & Wolf W. (2006). Certification of a new selenized yeast reference material (SELM-1) for methionine, selenomethionine and total selenium content and its use in an intercomparison exercise for quantifying these analytes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385: 168-180.
- Michalke B. (2003). Element speciation definitions, analytical methodology and some examples. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 122-139.

- Montes-Bayón M., Molet M. J., González E. B. & Sanz-Medel A. (2006). Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination in selenium-enriched plants (*Allium sativum* and *Brassica juncea*) and Se speciation by HPLC-ICP-MS. *Talanta*, 68: 1287-1293.
- Moreda-Piñeiro J., Alonso-Rodríguez E., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Fernández-Fernández E., Prada-Rodríguez D., Moreda-Piñeiro A., Bermejo-Barrera A. & Bermejo-Barrera P. (2006). Pressurized liquid extraction as a novel sample pre-treatment for trace element leaching from biological material. *Analytica Chimica Acta*, 572: 172-179.
- Moreno P., Quijano M. A., Gutiérrez A. M., Pérez-Conde M. C. & Cámara C. (2004). Study of selenium species distribution in biological tissues by size exclusion and ion exchange chromatography inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 524: 315-327.
- Navarro-Alarcón M. & Cabrera-Vique C. (2008). Selenium in food and the human body: A review. *Science of the total environment*, 400: 115-141.
- Negro R., Greco G., Mangieri T., Pezzarossa A., Dazzi D. & Hassan H. (2007). The influence of selenium supplementation on postpartum thyroid status in pregnant women with thyroid peroxidase autoantibodies. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92:1263-1268.
- Ohta Y., Kobayashi Y., Kosishi S. & Hirano S. (2009). Speciation analysis of selenium metabolites in urine and breath by HPLC- and GC-Inductively Coupled Plasma-MS after administration of selenomethionine and methylselenocysteine to rats. *Chemical Research in Toxicology*, 22: 1795-1801.
- Otha Y., Suzuki N., Kobayashi Y. & Hirano S. (2011). Rapid speciation and quantification of selenium compounds by HPLC-ICP MS using multiple standards labelled with different isotopes. *Isotopes in Environmental and Health Studies*; 47: 330–340.

Palomo M., Gutiérrez A. M., Pérez-conde M. C., Cámara C. & Madrid Y. (2014). Se metallomics during lactic fermentation of Se-enriched yogurt. *Food Chemistry*, 164, 371-379.

Patching S. G. & Gardiner R. H. E. (1999). Recent developments in selenium metabolism and chemical speciation: A review. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 13: 193-214.

Peachey E., McCarthy N. & Goenaga-Infante H. (2008). Acceleration of enzymatic hydrolysis of protein-bound selenium by focused microwave energy. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23: 487-492.

Pedrero Z., Elvira D., Cámara C. & Madrid Y. (2007a). Selenium transformation studies during Broccoli (*Brassica oleracea*) growing process by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (LC-ICP-MS). *Analytica Chimica Acta*, 596: 251-256.

Pedrero Z. & Madrid Y. (2009). Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review. *Analytica Chimica Acta*, 634: 135-152.

Pedrero Z., Madrid Y. & Cámara C. (2006). Selenium species bioaccessibility in enriched radish (*Raphanus sativus*): A potential dietary source of selenium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 2412-2417.

Pedrero Z., Murillo S., Cámara C., Schram E., Luten J. B., Feldmann I., Jakubowski & Madrid Y. (2011). Selenium speciation in different organs of African catfish (*Clarias gariepinus*) enriched through a selenium-enriched garlic based diet. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26: 116-125.

Pedrero Z., Ruíz Encinar J., Madrid Y. & Cámara C. (2007b). Identification of selenium species in selenium-enriched *Lens esculenta* plants by using liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and [⁷⁷Se]selenomethionine selenium oxide spikes. *Journal of Chromatography A*, 1139: 247-253.

- Pedrero Z., Ruíz Encinar J., Madrid Y. & Cámara C. (2007c). Application of species-specific isotope dilution analysis to the correction for selenomethionine oxidation in Se-enriched yeast sample extracts during storage. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22: 1061-1066.
- Peñas E., Frías J., Gómez R. & Vidal-Valverde C. (2010). High hydrostatic pressure can improve the microbial quality of sauerkraut during storage. *Food Control*, 21: 524-528.
- Peñas E., Martínez-Villaluenga C., Frías J., Sánchez-Martínez M. J., Pérez-Corona M. T., Madrid Y., Cámara C. & Vidal-Valverde C. (2012). Se improves índole glucosinolate hydrolysis products content, Se-methylselenocysteine content, antioxidant capacity and potential anti-inflammatory properties of sauerkraut. *Food Chemistry*, 132: 907-914.
- Pérez Méndez S., Blanco González E. & Sanz-Medel A. (2001). Hybridation of different chiral separation techniques with ICP-MS detection for the separation and determination of selenomethionine enantiomers: chiral speciation of selenized yeast. *Biomedical Chromatography*, 15: 181-188.
- Peynaud E. (1996). Vinificación en Tinto. Comportamiento de la fermentación. En: *Enología Práctica: Conocimiento y elaboración del vino* 3ª Edición. (Ed.), pp 179-192. Mundi-Prensa Libros S.A., España.
- Ponce de León C. A., Montes-Bayón M. & Caruso J. A. (2002). Elemental speciation by chromatographic separation with inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 974: 1-21.
- Priego-Capote F. & Luque de Castro M. D. (2007). Ultrasound-assisted digestion: A useful alternative in sample preparation. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70: 299-310.
- Quevauviller Ph. (2001). Accuracy and traceability in speciation analysis. En: *Trace element speciation for environment, food and health*. Ebdon L., Pitts L., Cornelis R., Crews H., Donard O. F. X. & Quevauviller Ph. (Eds.), (pp. 3-16). Royal Society of Chemistry, Reino Unido.

- Rayman M. P. (2000). The importance of selenium to human health. *The Lancet*, 356: 233-241.
- Rayman M. P. (2002). The argument for increasing selenium intake. *Proceedings of the Nutrition Society*, 61: 203-215.
- Rayman M. P. (2004). The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? *British Journal of Nutrition*, 92: 557-573.
- Rayman M. P. (2005). Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64: 527-542.
- Rayman M. P., Goenaga-infante H. & Sargent M. (2008). Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. *British Journal of Nutrition*, 100: 238-253.
- Rayman M. P., Stranges S., Griffin B. A., Pastor-Barriuso R. & Guallar E. (2011). Effects of supplementation with high-selenium yeast on plasma lipids: a randomized, controlled trial. *Annals of Internal Medicine*, 154: 656-665.
- Rayman M. P. (2012). Selenium and human health. *The Lancet*, 379: 1256-1268.
- Reid M. E., Duffield-Lillico A. J., Garland L., Turnbull B. W., Clark L.C. & Marshall J. R. (2002). Selenium supplementation and lung cancer incidence: An update of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 11: 1285-1291.
- Rodríguez-González R., Marchante-Gayón J. M., García Alonso J. I. & Sanz-Medel A. (2005). Isotope dilution analysis for elemental speciation: A tutorial review. *Spectrochimica Acta Part B*, 60: 151-207.
- Rosen A. L. & Hieftje G. M. (2004). Inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry for speciation analysis: applications and instrumentation. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectrometry*, 59: 135-146.

- Rotruck J. T., Pope A. L., Ganther H. E., Swanson A. B., Hafeman D. G. & Hoekstra W. G. (1973). Selenium biochemical role as a component of glutathione peroxidase, *Science*, 179: 588-590.
- Ruíz Encinar J., Sliwka-Kaszynska M., Polatajko A., Vacchina V. & Szpunar J. (2003a). Methodological advances for selenium speciation analysis in yeast. *Analytica Chimica Acta*, 500: 171-183.
- Ruíz Encinar J., Ouerdane L., Buchmann W., Tortajada J., Lobinski R. & Szpunar J. (2003b). Identification of water-soluble selenium-containing proteins in selenized yeast by size-exclusion-reversed-phase HPLC/ICPMS followed by MALDI-TOF and electrospray Q-TOF mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 75: 3765-3774.
- Salunke R., Rawat N., Tiwari V. K., Neelam K., Randhawa G. S., Dhaliwal H. S. & Roy P. (2012). Determination of bioavailable-zinc from biofortified wheat using a coupled *in vitro* digestion/Caco-2 reporter-gene based assay. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25: 149-159.
- SCF (Scientific Committee on Food). (2000). *Opinion of the Scientific Committee on Food on the tolerable upper intake level of selenium*. Comisión Europea, Bruselas.
- Schram E., Pedrero Z., Cámara C., Van der Heul J. W. & Luten J. B. (2008). Enrichment of African catfish with functional selenium originating from garlic. *Aquaculture Research*, 39: 850-860.
- Schrauzer G. N. (2000). Selenomethionine: A review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *Journal of Nutrition*, 130: 1653-1656.
- Schwarz K. & Foltz C. M. (1957). Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Journal of the American Chemical Society*, 79: 3292-3293.
- Scott R. & MacPherson A. (1998). Selenium supplementation in sub-fertile human males. *British Journal of Urology*, 82: 76-80.

- Seppänen M. M., Kontturi J., López Heras I., Madrid Y., Cámara C. & Hartikainen H. (2010). Agronomic biofortification of *Brassica* with selenium-enrichment of SeMet and its identification in *Brassica* seeds and meal. *Plant Soil*, 337: 273-283.
- Shiobara Y., Yoshida T. & Suzuki K. T. (1998). Effects of dietary selenium species on Se concentrations in hair, blood and urine. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 152: 309-314.
- Skoog D. A., Holler F. J. & Nieman T. A. (2001). Espectrometría de masas atómica. En: *Principios de Análisis Instrumental, 5ª Edición*. (Eds.), pp. 269-288. McGraw Hill, España.
- Stabnikova O., Ivanow V., Larionova I., Stabnikov V., Bryszewska M. A. & Lewis J. (2008). Ukrainian dietary bakery product with selenium-enriched yeast. *LWT-Food Science and Technology*, 41: 890-895.
- Stefánka Zs., Ipolyi I., Dernovics M. & Fodor P. (2001). Comparison of sample preparation methods based on proteolytic enzymatic processes for Se-speciation of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) samples. *Talanta*, 55: 437-447.
- Stranges S., Marshall J. R., Trevisan M., Natarajan R., Donahue R. P., Combs G. F., Fariano E., Clark L. C. & Redi M. E. (2006). Effects of selenium supplementation on cardiovascular disease incidence and mortality: secondary analyses in a randomized clinical trial. *American Journal of Epidemiology*, 301: 39-51.
- Suchan P., Pulkrabová J., Hajslová J. & Kocourek V. (2004). Pressurized liquid extraction in determination of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in fish samples. *Analytica Chimica Acta*, 520: 193-200.
- Suzuki K. T. (2005). Metabolomics of Selenium: Se metabolites based on speciation studies. *Journal of Health Science*, 51: 107-114.
- Suzuki K. T., Doi C. & Suzuki N. (2006). Metabolisms of ⁷⁶Se-methylselenocysteine compared with that of ⁷⁷Se-selenomethionine and ⁸²Se-selenite. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 217: 185-195.

- Suzuki Y., Hashiura Y., Sakai T., Yamamoto T., Matsukawa T., Shinohara A. & Furuta N. (2013). Selenium metabolism and excretion in mice after injection of ⁸²Se-enriched selenomethionine, *Metallomics*, 5: 445-452.
- Szpunar J., Lobinski R. & Prange A. (2003). Hyphenated techniques for elemental speciation in biological systems. *Applied Spectroscopy*, 57: 102A-112A.
- Takebe G., Yarimizu J., Saito Y., Hayashi T., Nakamura H., Yodoi J., Nagasawa S. & Takahashi K. (2002). Comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 41254-41258.
- Tapiero H., Townsend D. M. & Tew K. D. (2003). The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57: 134-144.
- Templeton D. M., Ariese F., Cornelis R., Danielsson L., Muntau H., Van Leeuwen H. P. & Lobinski R. (2000). Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects and methodological approaches. *Pure Applied Chemistry*, 72: 1453-1470.
- Thiry C., Schneider Y., Pussemier L., Temmerman L. & Ruttens A. (2013). Selenium bioaccessibility and bioavailability in Se-enriched food supplements. *Biological Trace Elements Research*, 152: 152-160.
- Toulis K. A., Anastasilakis A. D., Tzellos T. G., Goulis D. G. & Kouvelas D. (2010). Selenium supplementation in the treatment of Hashimoto's thyroiditis: a systematic review and a meta-analysis. *Thyroid*, 20:1163-1173.
- Tsuji P. A., Carlson B. A., Naranjo-Suarez S., Yoo M., Xu X., Fomenko D. E., Gladyshev V. N., Hatfield D. L. & Davis C. D. (2012). Knockout of the 15 kDa selenoprotein protects against chemically-induced aberrant crypt formation in mice. *PLOS ONE*, 7: e50574.

Tsuji P. A., Naranjo-Suarez S., Carlson B. A., Tobe R., Yoo M. & Davis C. D. (2011). Deficiency in the 15 kDa selenoprotein inhibits human colon cancer cell growth. *Nutrients*, 3: 805-817.

USDA (United States Department of Agriculture), Food and Nutrition Board. (2000). *Dietary Reference Intakes: Vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids*. National Academy Press, Estados Unidos.

USDA (United States Department of Agriculture), Agricultural Research Service. (2012). *USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 25*. Nutrient Data Laboratory Home Page.

Vale G., Rodrigues A., Rocha A., Rial R., Mota A. M., Gonçalves M. L., Fonseca L. P. & Capelo J. L. (2010). Ultrasonic assisted enzymatic digestion (USAED) coupled with high performance liquid chromatography and electrothermal atomic absorption spectrometry as a powerful tool for total selenium and selenium species control in Se-enriched food supplements. *Food Chemistry*, 121:268-274.

Vonderheide A. P., Wrobel K., Kannamkumarath S. S., B'Hymer C., Montes-Bayón M., Ponce de León C. & Caruso J. A. (2002). Characterization of selenium species in Brazil nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5722-5728.

Wang Y., Wang X. & Wong Y. (2013). Generation of selenium-enriched rice with enhanced grain yield, selenium content and bioavailability through fertilization with selenite. *Analytical Methods*, 141: 2385-2393.

Warburton E. & Goenaga-Infante H. (2007). Methane mixed plasma-improved sensitivity of inductively coupled plasma mass spectrometry detection for selenium speciation analysis wheat-based food. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22: 370-376.

Wayne R. & Goldschmidt R. J. (2004). Selenomethionine contents of NIST wheat reference materials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378: 1175-1181.

- Welch R. M. & Graham R. D. (2005). Agriculture: the real nexus for enhancing bioavailable micronutrients in food crops. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18: 299-307.
- White P. J. & Broadley M. R. (2009). Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diet – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, 182: 49-84.
- Wood S. M., Beckham C., Yosioka A., Darban H. & Watson R. R. (2000). B-carotene and selenium supplementation enhances immune response in aged humans. *Integrative Medicine*, 2: 85-92.
- Xu C. L., Wang Y. Z., Jin M. L. & Yang X. Q. (2009). Preparation, characterization and immunomodulatory activity of selenium-enriched exopolysaccharide produced bacterium *Enterobacter Cloacae* Z0206. *Bioresource Technology*, 100: 2095-2097.
- Yang L., Mester Z. & Sturgeon E. (2004a). Determination of methionine and selenomethionine in yeast by species-specific isotope dilution GC/MS. *Analytical Chemistry*, 76: 5149-5156.
- Yang L., Sturgeon R. E., Wolf W. R., Goldschmidt R. J. & Mester Z. (2004b). Determination of selenomethionine in yeast using CNBr derivatization and species specific isotope dilution GC ICP-MS and GC-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19: 1448-1453.
- Yazdi M. H., Mahdavi M., Setayesh N., Esfandyar M. & ShahverdiA. R. (2013). Selenium nanoparticle-enriched *Lactobacillus brevis* causes more efficient immune responses in vivo and reduces the liver metastasis in metastatic form of mouse breast cancer. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21: 33-42.
- Yu S. Y., Zhu Y. J. & Li W. G. (1997). Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Qidong. *Biological Trace Elements Research*, 56: 117-124.

IV. OBJETIVOS

IV. OBJETIVOS

Debido a la esencialidad del selenio para los seres vivos y los problemas asociados a su deficiencia, sumado al hecho de que su esencialidad depende de la concentración y especie química en que éste sea ingerido, es crucial conocer el contenido y las especies de selenio presentes en los alimentos. Ante la problemática existente de un consumo de selenio insuficiente ha surgido el interés por desarrollar suplementos nutricionales y alimentos funcionales. Determinados microorganismos como las levaduras o bacterias son unos importantes aliados en este campo ya que presentan la capacidad de acumular grandes cantidades de selenio y de transformar selenio inorgánico en compuestos orgánicos, que son considerados nutricionalmente más seguros y bioactivos que las especies inorgánicas. Del mismo modo, con el fin de comprender las diferentes funciones de este elemento en el organismo, es importante evaluar su metabolismo una vez ingerido.

Por todo lo expuesto anteriormente, los principales objetivos del presente trabajo de investigación se centran en el desarrollo de alimentos enriquecidos en selenio que conlleven una fermentación para su elaboración mediante el uso de levaduras y/o bacterias, y su posterior caracterización mediante el empleo de técnicas analíticas basadas en el acoplamiento del HPLC con el ICP-MS. Por otro lado, y con el fin de evaluar el metabolismo de este elemento una vez ingerido, se ha estudiado *in vivo* la acumulación y transformación de selenio en ratas suplementadas con alimentos enriquecidos en selenio utilizando para ello isotopos estables de selenio como trazadores. Todos estos objetivos principales se detallan a continuación:

1. Desarrollo y caracterización de alimentos enriquecidos en selenio, que implican un proceso de fermentación, tanto alcohólica como láctica. Dentro de estos cabe destacar:

- 1.1. Estudio de la incorporación de selenio durante la elaboración de vino y cerveza mediante la acción de levadura del género *Saccharomyces*.

1.2. Estudio de la incorporación de selenio durante la elaboración de pan selenizado obtenido por acción de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Estudio de la bioaccesibilidad del selenio mediante procedimientos *in vitro* de digestión gastrointestinal, y de la influencia del tipo de harina empleada en el proceso de elaboración del pan.

1.3. Estudio de la incorporación de selenio durante la preparación de col fermentada (chucrut) en presencia de selenio por la acción de la bacteria *Lactobacillus plantarum*. Influencia del selenio en las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias del producto obtenido.

2. Evaluación del metabolismo del selenio en ensayos *in vivo* mediante el empleo de ratas *Wistar* suplementadas con chucrut enriquecido con selenio marcado isotópicamente.

Para la consecución de los objetivos indicados anteriormente se requiere la existencia en paralelo de un objetivo transversal que implica:

3. Desarrollo de métodos analíticos basados en el empleo de técnicas de ICP-MS y análisis por dilución isotópica (modalidad de especies no específica o post-columna) para la identificación y cuantificación de especies en las muestras objeto de estudio. Para llevar a cabo este objetivo principal, ha sido necesario alcanzar los siguientes objetivos específicos:

3.1. Optimizar el procedimiento de extracción cuantitativa de especies de selenio en las diferentes matrices, utilizando para ello distintos métodos de extracción, asistida por ultrasonidos, con incubación y extracción con microondas.

3.2. Establecer la identidad de las distintas especies de selenio presentes así como su cuantificación mediante LC-ICP-MS, utilizando para ello diferentes mecanismos de separación, y técnicas como la dilución isotópica.

3.3. Empleo de isótopos de selenio estables como trazadores para el estudio tanto de procesos de biotransformación de selenio durante la elaboración del alimento como del metabolismo del mismo una vez ingerido.

3.4. Validación de los resultados obtenidos utilizando materiales de referencia, distintas metodologías analíticas y técnicas analíticas, así como distintos mecanismos de separación cromatográficos.

V. PARTE EXPERIMENTAL

V. CAPÍTULO 1. ESTUDIOS DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DE SELENIO EN LA ELABORACIÓN DE ALIMENTOS OBTENIDOS POR FERMENTACIÓN MEDIANTE LA ACCIÓN DE LEVADURA *SACCHAROMYCES*

El selenio es considerado un elemento esencial para los seres vivos debido a sus propiedades antioxidantes y anticancerígenas y, puesto que la principal fuente de este elemento es la dieta, se hace necesaria una ingesta adecuada de este nutriente a través de los alimentos. Sin embargo, en muchos países no se alcanza la cantidad diaria recomendada de este elemento, debido a lo cual en los últimos años ha crecido el interés en el desarrollo de alimentos funcionales y suplementos de selenio para suplir esas carencias.

Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* presentan una elevada tolerancia al selenio y una gran capacidad para transformar las especies inorgánicas en compuestos orgánicos. Debido a su facilidad y bajo coste de producción, las levaduras selenizadas han sido ampliamente utilizadas como suplementos nutricionales de selenio. La principal problemática que existe respecto a ellas es la dificultad para caracterizar completamente las especies de selenio que contienen ya que, a pesar de que se sabe que el selenio se encuentra principalmente como SeMet, también existen otras especies aún por identificar. Además, el porcentaje de SeMet presente en la levadura varía de unos estudios a otros, lo que podría deberse a diferencias tanto en el procedimiento de elaboración de las mismas, como en la metodología analítica empleada para la caracterización de las especies de selenio.

Ya que la levadura *Saccharomyces* interviene frecuentemente en la elaboración de alimentos fermentados, en este capítulo se ha aprovechado la capacidad de la misma de biotransformar selenio para incorporarlo durante la fermentación de alimentos y enriquecerlos de esta manera en selenio. Para este estudio se han escogido alimentos derivados de una fermentación y que son ampliamente consumidos en la dieta, como el vino, la cerveza o el pan, donde la levadura es el elemento central para la producción de los mismos. A pesar de que en todos estos alimentos se utilizan cereales (cebada, trigo) o frutas (uva) como materias primas, con lo cual también

podrían ser enriquecidos a través de procesos de biofortificación agronómica, se ha optado por la adición directa del selenio en el momento de la elaboración del producto alimenticio, ya que el proceso de biofortificación depende de factores más difícilmente controlables, como las condiciones atmosféricas, las cuales inciden directamente en el crecimiento de la planta, así como la compactación o irrigación del suelo donde éstas sean cultivadas. Además, en la planta se pueden dar procesos de translocación del elemento, con lo que sólo una fracción estará disponible en la parte de la planta que se utilice para elaborar el alimento. Sin embargo, la adición directa en la fabricación del alimento, asegura una mayor presencia del selenio en el alimento resultante. De esta manera, y mediante el uso de LC-ICP-MS así como diferentes metodologías analíticas, se han identificado y cuantificado las especies de selenio presentes en estas matrices alimentarias.

En el primer trabajo ("**Selenium biotransformation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during white wine manufacture: Laboratory-scale experiments**", *Food Chemistry* (2011), 124: 1050-1055), presentado en la sección V.1.1., se evaluó la tolerancia de la levadura a diferentes cantidades de selenio, en forma de selenito, y su biotransformación durante el proceso de vinificación del vino blanco, utilizando para ello las dos especies de levadura más comunes en este proceso, *Saccharomyces cerevisiae* y *S. bayanus*. Para ello se determinó el contenido de selenio total y las especies de selenio tanto en el vino como en la levadura residual, obtenidos tras la elaboración. Previamente a la vinificación, se llevó a cabo un estudio de viabilidad celular de la levadura en presencia de distintas cantidades de selenio, lo que permitió comprobar que su crecimiento no se veía afectado por la presencia de este elemento en el medio de cultivo. Además, se comprobó que las distintas especies de levadura empleadas no producían diferencias en los resultados obtenidos de acumulación y transformación de selenio. La extracción de especies mediante diferentes tratamientos (asistida por sonda de ultrasonidos (USP), con y sin hidrólisis enzimática), además del uso de distintos

mecanismos de separación cromatográficos (intercambio aniónico, PRP-X100; fase inversa C18, Water SymmetryShield; y combinación de intercambio iónico/exclusión molecular, Shodex-Asahipak GS-220 HQ) acoplados al ICP-MS, permitió extraer e identificar las especies presentes en el vino y en la levadura. Mientras que en la levadura la principal especie observada fue la SeMet, la cual se encontraba en su mayor parte unida a proteínas, en el caso de la matriz vínica se observó la SeMet pero en pequeñas concentraciones, siendo mayoritaria en este caso la forma oxidada de la misma, y ambas presentes en el vino en su forma libre, es decir, sin estar unidas a proteínas. Presumiblemente, la SeMet presente en el vino es producto de la transferencia de esta especie desde la levadura al llevarse a cabo la separación de ambas fases y, a partir de la SeMet en su forma libre, se haya producido con mayor facilidad la oxidación de la misma. De una forma u otra, se confirma la biotransformación de selenito a SeMet por parte de la levadura durante el proceso de vinificación.

En lo que concierne al vino, además de lo presentado en este primer trabajo, se evaluó el efecto de la presencia de ciertos compuestos antioxidantes normalmente presentes en el vino, como los taninos o sulfitos, en la oxidación producida de la SeMet en este alimento (trabajo pendiente de publicación). Para ello se realizó la vinificación con mosto de uva tinta, con elevado contenido de taninos, sin observarse diferencias en la biotransformación del selenio. Por otro lado, se realizó el sulfitado del vino adicionando para ello una concentración equivalente a 30 y 200 $\mu\text{g SO}_2/\text{mL}$ en forma de metabisulfito sódico. Se observó que el sulfitado con 30 $\mu\text{g/mL}$ producía una ligera disminución de la oxidación de SeMet, mientras que el uso de elevadas cantidades de metabisulfito sódico (200 $\mu\text{g/mL}$), producía una biotransformación del selenio muy baja, encontrándose casi en su totalidad como Se(IV), probablemente debido a que grandes dosis de bisulfito pueden producir la inhibición de la actividad celular de la levadura (Figura 10). Además, se comparó el uso de la sonda de ultrasonidos con la incubación a temperatura controlada y con la medida directa del vino sin tratar, sin observarse diferencias en la cantidad de SeMet oxidada formada, lo cual demostró que la oxidación de la SeMet no se producía por los tratamientos de extracción de especies utilizados sino durante el almacenamiento del vino.

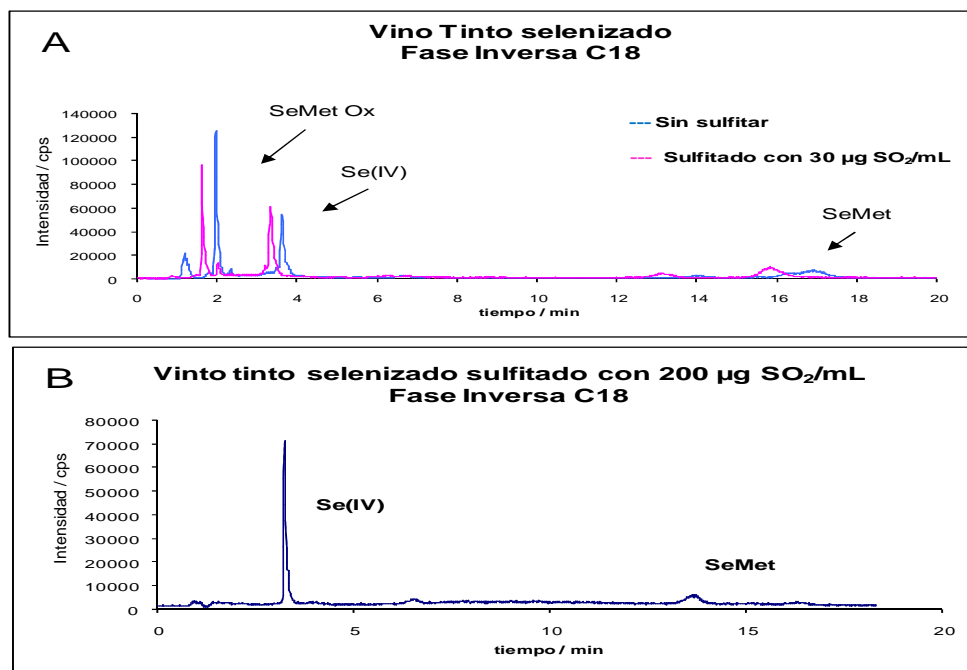


Figura 10. Efecto del sulfitado en la biotransformación del selenio durante el proceso de vinificación empleando A) 30 µg SO₂/mL y B) 200 µg SO₂/mL.

Paralelamente a la realización del primer trabajo, se llevó a cabo una colaboración con el Instituto de Química de la Universidad Federal de Bahía (Salvador, Brasil), sobre la biotransformación del selenio, en forma de selenito, durante la producción de cerveza, que dio como resultado el segundo trabajo de este capítulo presentado en la sección IV.1.2. (“**Selenite biotransformation during brewing. Evaluation by HPLC-ICP-MS**”. *Talanta* (2012), 88: 272-276), en el que se elaboraron dos tipos de cerveza, *Ale* y *Lager* filtradas, utilizando levadura *Saccharomyces cerevisiae* y *S. uvarum*, respectivamente. Además de estas cervezas, se elaboró

la variedad *Ale* turbia o sin filtrar, cuyo consumo implica la ingesta de la cerveza con su propia levadura proveniente de la fermentación.

En este caso, el empleo de las distintas especies de levadura tampoco produjo diferencias en los resultados obtenidos en lo que respecta a incorporación y biotransformación de selenio. Por otro lado, los distintos tratamientos de extracción de especies (diálisis, extracción asistida con sonda de ultrasonidos con y sin hidrólisis enzimática) utilizados fueron validados mediante el análisis de un material de referencia de levadura selenizada (SELM-1). Estos tratamientos, unidos al análisis por HPLC-ICP-MS, permitieron la identificación y cuantificación de las distintas especies de selenio, encontrándose de nuevo la SeMet unida a proteínas como especie mayoritaria en la levadura y la SeMet oxidada libre la más abundante en la cerveza, cuando ambas fracciones han sido separadas. La cerveza con la levadura incorporada permitió obtener recuperaciones cuantitativas del selenio en el producto final, ya que éste se encuentra mayoritariamente en la levadura.

Los estudios realizados con bebidas fermentadas confirman que la levadura es la principal responsable de la biotransformación del selenito a SeMet, incorporándolo a sus proteínas, y que parte de esa SeMet es transferida a la bebida en la etapa de separación de la levadura, quedando en su forma libre, lo que provoca su oxidación, motivo por el cual la principal especie en el vino y la cerveza es la SeMet oxidada, sin observarse esta especie cuando se evita el paso de separación de fases, es decir, en el caso de la cerveza *Ale* turbia. Por otro lado, en estos estudios se pone de manifiesto que ni el proceso de fermentación alcohólica ni de crecimiento celular se ve afectado por la adición de selenio, en forma de selenito, en cantidades de hasta 10 µg/mL. Sin embargo, también muestran que para aprovechar al máximo las propiedades de la levadura respecto a la biotransformación e incorporación de selenio, sería adecuado un consumo de alimentos que la contuvieran como ingrediente en su producto final, asegurando así que con su ingesta también se está ingiriendo la SeMet, puesto que la levadura incorpora el selenio a sus propias proteínas como dicha forma. En esta línea se encuentra el tercer trabajo presentado en la

sección IV.1.3. (“**Preparation and characterization of a laboratory scale selenomethionine-enriched bread. Selenium bioaccessibility**”). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Enviado), donde se procedió a elaborar pan selenizado, blanco e integral, a través de la biotransformación por parte de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que en este caso permanece en el producto final. Para la selenización del pan es muy importante asegurar que hay una buena homogeneización inicial de los ingredientes, lo cual se ve dificultado debido a que casi todos son sólidos. Por ello, para conseguir esta homogeneización se utilizaron diferentes procedimientos de amasado, el tradicional manual o el mecánico. Por otro lado, se aplicaron distintas metodologías analíticas para la posterior determinación de especies de selenio, entre ellas la extracción con y sin hidrólisis enzimática y la hidrólisis ácida, utilizando para ello la sonda de ultrasonidos, incubación a temperatura controlada y extracción asistida por microondas, unido a varios mecanismos de separación diferentes (cromatografía de intercambio aniónico, PRP-X100; y cromatografía de fase inversa C8, Zorbax). La determinación del contenido total de selenio se llevó a cabo por dilución isotópica y la cuantificación de sus especies utilizando el modo post-columna de esta técnica, que permite usar un trazador de forma química diferente al de las especies a cuantificar, lo cual se hizo empleando como trazador ^{77}Se -selenito. Con esta metodología la concentración de selenio se obtiene mediante la relación $^{78}\text{Se}/^{77}\text{Se}$.

La selenización del pan se produjo con éxito tras el enriquecimiento de la levadura con selenito, encontrándose principalmente la SeMet como especie final, no siendo así cuando el selenito era adicionado directamente a la masa, donde se forman otros compuestos intermedios de selenio de bajo peso molecular. Además, para una correcta homogeneización de la levadura y por lo tanto del selenio, fue necesario mezclar los ingredientes mecánicamente en lugar de con el amasado tradicional. Finalmente, la aplicación de un método de digestión gastrointestinal *in vitro* permitió evaluar la bioaccesibilidad del selenio en el pan, que en caso del pan blanco es aproximadamente del 80% del selenio presente en el pan, con la SeMet como principal especie encontrada en el extracto gastrointestinal. Sin embargo, en el caso del pan selenizado elaborado

con pan integral se puso de manifiesto la baja bioaccesibilidad del selenio, siendo de hasta un 40%. Estos resultados han sido observados para otros elementos como en el caso del cinc. La causa puede ser debida al elevado contenido en fibra y fitatos del pan integral que dificultan la digestibilidad de los nutrientes. Este hecho es de especial relevancia debido al elevado consumo del pan integral.

V.1.1. BIOTRANSFORMACIÓN DE SELENIO MEDIANTE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Y *SACCHAROMYCES BAYANUS* DURANTE LA PRODUCCIÓN DE VINO BLANCO: EXPERIMENTOS A ESCALA DE LABORATORIO.

“Selenium biotransformation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during white wine manufacture: Laboratory-scale experiments”, *Food Chemistry* (2011), 124: 1050-1055.

Parte de este trabajo fue presentado en:

“XI Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica”, Huelva, España. Junio, 2008.

“XXI Reunión Nacional de Espectroscopia, V Congreso Ibérico de Espectroscopia Analítica”, Murcia, España. Septiembre, 2008.

Y el trabajo completo fue presentado en el “9th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine”, Kioto, Japón. Junio, 2010.



Selenium biotransformation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during white wine manufacture: Laboratory-scale experiments

M.T. Pérez-Corona^a, M. Sánchez-Martínez^a, M.J. Valderrama^b, M.E. Rodríguez^c, C. Cámara^a, Y. Madrid^{a,*}

^a Analytical Chemistry Department, Chemistry Faculty, Complutense University, 28040 Madrid, Spain

^b Microbiology Department III, Biology Faculty, Complutense University, 28040 Madrid, Spain

^c Microbiology and Genetic Laboratory, CASEM, Biomedicine, Biotechnology and Public Health, Cádiz University, Cádiz, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 March 2010

Received in revised form 24 June 2010

Accepted 22 July 2010

Keywords:

Selenium speciation
Selenium-enriched wine
Se biotransformation
Yeast
HPLC-ICP-MS

ABSTRACT

The main purpose of this laboratory-scale study was to evaluate the transformation of inorganic selenium, as sodium selenite, when added to white grape juice as part of the fermentation process of white wine. The participation of yeast, added in the fermentation of the must, is necessary to convert inorganic selenium into organoselenium species. Two different yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* were used for fermentation. The effects of different Se concentrations on cells and their viability during fermentation were evaluated. The alcoholic fermentation that produced wine was not affected by the presence of selenium, regardless of the type of *Saccharomyces* used. After 21 days of fermentation, the white wine and residual yeast were separated and analysed by ICP-MS and LC-ICP-MS for determination of total selenium and speciation. Selenomethionine was found to be the main Se-species in the selenised white wine. The results obtained are preliminary but they could be considered for future studies using both pilot and full-scale vinification processes.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Many recent studies have indicated that selenium, as selenoamino acids and selenoproteins, plays an important role in the immune system. It reduces the presence of free radicals, produced from oxygen metabolism, which may contribute to the development of chronic diseases such as cancer and heart disease (Combs & Gray, 1998; Goldhaber, 2003).

The primary source of selenium is food. Dietary intakes are not well documented and recommended values vary between countries and health institutions. The recommended dietary allowance (RDA) for selenium is 55 µg/day for men and women (DRI, 2000). The German and Austrian Nutrition Society and the Swiss Nutrition Association recommend levels of 30 and 70 µg/day for men and women, respectively (Reference Values for Nutrient Intake, 2002). The WHO suggests that a Se intake of 400 µg/day is safe (WHO, 1996) and states that functional signs related to Se overexposure are observed at intake levels in the range of 750–858 µg/day. The recommended EC tolerable upper intake level of Se is 300 µg/day (SFC, 2000).

To prevent selenium deficiency, several approaches have been previously applied. Consumption of supplements based on selen-

ised yeast has been the most popular. The ability of *Saccharomyces cerevisiae* to transform inorganic selenium into organoselenium compounds (especially selenomethionine) is known and it is dependent on growth conditions. Yeast is able to accumulate high concentrations of selenium (3 mg/g) (Korhola, Vainio, & Edelman, 1986) and transform inorganic selenium mainly into selenomethionine (Ponce de León, Bayón, Paquín, & Caruso, 2002; Reyes et al., 2004), which has been used as a Se supplement. Several authors have reported preparation of selenised foodstuffs, such as dairy products, mediated by a fermentation process (Alzate, Fernández-Fernández, Pérez-Conde, Gutiérrez, & Cámara, 2008).

Using this approach, the aim of this laboratory-scale study was to evaluate, for the first time, the transformation of selenite by *S. cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during the manufacture of white wine. Several parameters affecting fermentation in the presence of selenium were evaluated. For characterisation of selenium species, three chromatographic columns (an anion-exchange column, a reverse-phase column and a Shodex-Asahipak column that combines size exclusion and ion exchange mechanisms) were utilised. The ultimate objective was to evaluate the possibility of producing selenised white wine, by studying the selenium biotransformation in the fermentation process and its potential application to pilot and full-scale vinification processes.

* Corresponding author.

E-mail address: ymadrid@quim.ucm.es (Y. Madrid).

2. Materials and methods

2.1. Instrumentation

A Thermo-X Series ICP-MS (Winsford, UK), fitted with a Meinhard nebuliser and Peltier-cooled spray chamber (2 °C), was used for ^{82}Se monitoring. The following instrumental conditions were applied: forward power 1250 W, plasma gas flow rate 15.0 l/min, auxiliary gas flow rate 1.26 l/min, and carrier gas flow rate 1.1 l/min.

Samples were digested for total selenium determination in double-walled advanced composite vessels (ACV) using a microwave oven (CEM MSP 1000, CEM Corporation, Matthews, NC).

A Sonopuls ultrasonic homogeniser (Bandelin, Berlin, Germany), fitted with a GM2200 HF generator at a frequency of 20 kHz and a titanium microtip with a diameter of 3 mm, was used for the extraction of selenium species. The power applied was 40 W at a frequency of 20 kHz. For molecular weight fractionation, 10 kDa cut-off filters (Millipore, Bedford, MA), together with an Eppendorf centrifuge 5804 F34-6-38 (Hamburg, Germany) were utilised.

Chromatographic separations were carried out with a high-pressure pump, Jasco PU-2089 (Crenella, Italy). Samples were injected using a six-port Rheodyne 7725i sample injection valve fitted with a 100 µl loop. The separations of the seleno compounds were carried out with anion-exchange (Hamilton PRP-X100), reverse-phase (Waters SymmetryShield RP18), and size exclusion/ion exchange (Shodex-Asahipak GS-220 HQ) columns.

The fermentation process was performed in a water bath at a controlled temperature. Cell counting was carried out using a Neubauer bright-line counting chamber (0.100 mm depth × 0.0025 mm²; Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Germany) and a microscope (Nikon 71622, 1.25×, Tokyo, Japan).

2.2. Chemical reagents

All reagents used were of analytical grade and solutions were prepared with deionised Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA). Selenomethionine (SeMet), selenomethylselenocysteine (SeMetSeCys), and selenocystine (SeCys₂) were purchased from Sigma and dissolved with Milli-Q water with 3% hydrochloric acid for better dissolution. Solutions of inorganic selenium were prepared by dissolving sodium selenite (Na₂SeO₃) and selenate (Na₂SeO₄), purchased from Merck, in Milli-Q water. Stock solutions were stored at 4 °C and working solutions were prepared daily by dilution. Selenomethionine-Se-oxide (SeMetO) was obtained by oxidation of selenomethionine using hydrogen peroxide.

The enzymatic hydrolysis was achieved using a non-specific enzyme, protease XIV, purchased from Sigma-Aldrich.

Separation of selenium species for anion-exchange chromatography was performed by using 10 mM citric acid (Sigma) in 2% (v/v) methanol (Sharlab S.L., Barcelona, Spain) adjusted to pH 5 with ammonium hydroxide (Fluka) as mobile phase. For reverse-phase HPLC a mixture formed by 0.1% heptafluorobutyric acid (HFBA), 0.1% formic acid and 1 mM cysteine in 2% (v/v) methanol was employed. The mobile phase used for the Shodex-Asahipak column was 25 mM ammonium acetate (Fluka) at pH 6.7.

YEPD medium composed of 1% yeast extract, 2% glucose (Fluka), and 2% peptone water was employed for cell viability studies. This solution was also used as a solid by preparing it in 2.5% agar (YEPD agar). Two common yeasts, used in white wine manufacture, were employed for fermentation: *S. cerevisiae* (Fermivin, no. 7013 INRA, Narbonne) and *S. bayanus* (Enoferm, QA 23™). The must employed in wine manufacture came from the white grape "Palomino fino".

2.3. Cell incubation

In wine manufacture it is important to employ cell incubation. The control and use of a fixed and known concentration of yeast cells, usually 2×10^6 cell/ml, is of paramount importance. This concentration was achieved by adding 1 ml of Milli-Q water to a portion of yeast. To avoid the turbidity of the resulting solution, several dilutions (1/10, 1/100, 1/1000 and 1/10,000) were prepared and 100 µl of each were taken and plated onto YEPD agar for incubation at 28 °C for 2–3 days. The resulting yeast colonies were stored at 4 °C. Experiments were always performed with freshly incubated cells to ensure an adequate cell density, which was measured by counting using a haemocytometer chamber (Neubauer chamber) after the methylene blue method was applied.

2.4. Cell viability curves

Growth curves were obtained from two yeasts: *S. cerevisiae* and *S. bayanus*. Around 2×10^6 yeast cells per ml were inoculated in 50 ml of different media (YEPD solution, grape juice, and grape juice with selenium (Se(IV), 250 µg)). Cell density was measured by counting every 2 h.

2.5. Fermentation process

Sodium selenite (from 50 to 1000 µg) and 2×10^6 yeast cells per ml were added to 50 ml of grape juice and left to ferment for 21 days at 20 °C. The resulting product was centrifuged to separate the residual yeast from the white wine. Fermentation was carried out under sterile conditions. For this purpose, the laboratory materials used (glass or plastic), the grape juice and the YEPD solution were autoclaved at 110 °C for 20 min. Filters of 0.22 µm were used to sterilise standard solutions. Manipulation during the fermentation process was carried out in a laminar flow cabinet.

2.6. Total selenium determination

Both fractions resulting from the fermentation residual yeast and 3 ml of selenised white wine) were digested with 2.5 ml of concentrated nitric acid in an analytical microwave oven. The resulting solutions were diluted to 25 ml with deionised water and the selenium concentration was determined by ICP-MS using the conditions in Table 1.

2.7. Selenium species determination

The extraction of the selenium species from both post-fermentation fractions (residual yeast sample and 3 ml of white wine) was performed by sonication (2 min) after addition of 3 ml of deionised water and 20 mg of protease XIV. This procedure has been successfully applied in previous selenium speciation studies (Pedrero, Ruiz-Encinar, Madrid, & Cámara, 2007). The extracts were centrifuged at 7500g for 20 min using a 10 kDa cut-off filter. Several chromatographic columns, based on different separation mecha-

Table 1
Operating conditions for total selenium determination.

Parameters	ICP-MS conditions
Forward power	1250 W
Plasma gas flow rate	15.0 l/min
Auxiliary gas flow rate	0.73 l/min
Carrier gas flow rate	0.7 l/min
Nebuliser type	Meinhard
Spray chamber type	Impact bead quartz
Data acquisition mode	Time resolved analysis
Isotopes monitored	^{77}Se , ^{78}Se , ^{82}Se

nisms coupled to ICP-MS, were used for selenium speciation: anion-exchange (PRP-X100), reversed phase (SymmetryShield RP18) and size exclusion/ion exchange (Shodex-Asahipak). Samples were injected using a six-port Rheodyne 7725i sample injection valve fitted with a 100 µl loop. The column flow was 1 ml/min for the PRP and SymmetryShield columns, and 0.8 ml/min for the Shodex column. The chromatographic parameters are showed in Table 2.

Identification and quantification of selenium species were done comparing the retention times of standards and using the standard addition method. Blanks analysis were performed to evaluate the occurrence of seleno species (Se(VI) and SeMet) from impurities in the enzymes used for sample extraction (Cuderman & Stibilj, 2009).

3. Results and discussion

3.1. Wine fermentation in the presence of increasing inorganic selenium concentrations

Quantities ranging from 50 to 1000 µg of sodium selenite salt were added to the growth media (which contained 50 ml of grape juice and 2×10^6 yeast cells per ml), in order to evaluate the maximum quantity of selenium that was compatible with the alcoholic fermentation. The total selenium found after fermentation of the white wine is presented in Table 3. When 200–500 µg (4–10 µg/l) of Se(IV) were added, the percentage of selenium incorporated by the wine was 55–60%. Increasing the Se to around 1000 µg resulted in a decrease in this percentage (to around 30%). This was because most of the selenium remained in the yeast. After these initial findings, experiments were focused on the study of cell viability using Se(IV) in the 50–500 µg range.

Cell viability studies using *S. cerevisiae* and *S. bayanus*, which are both commonly used in the fermentation process of must from white grape, were carried out. It is known that the latter yeast presents a greater resistance to alcohol grade than the former and it is able to ferment over a wider temperature range. Keeping the activity of the microorganisms (yeast) at a high level during fermentation was of critical importance, since alcohol production depended, amongst other factors, on the yeast's ability to transform sugar into alcohol. Therefore, and as a first step, the effect of selenium on cell growth during fermentation was evaluated by obtaining growth curves (with and without selenium) for both *S. cerevisiae* and *S. bayanus* after their inoculation in different media: YEPD medium (control), must and must with selenium (250 µg of Se(IV)) (see Fig. 1 for *S. cerevisiae* (1a) and *S. bayanus* (1b) in the different culture media). Similar behaviour was observed for both yeasts in the different media, including the one containing inorganic selenium, which meant that the presence of selenium in the must did not hamper its fermentation. This is important because this should be the first step to be considered when manufacturing selenised white wine.

3.2. Transformation of inorganic selenium during white wine must fermentation

To evaluate selenite biotransformation during fermentation, the residual yeast and white wine were digested with protease XIV.

Table 3

Total selenium in selenised white wine after fermentation process.^a

µg Se added	µg Se in white wine ^b	% Se in white wine
0	<LD	
50	15 ± 1	30.3
100	30 ± 6	30.6
150	47 ± 5	30.8
200	115 ± 8	57.5
300	167 ± 6	55.6
500	300 ± 10	60.3
1000	300 ± 10	29.7

^a Three independent determinations were averaged; fermentation time 21 days.

^b Final volume of white wine: 50 ml.

After enzymatic hydrolysis, samples were centrifuged and the supernatants filtered through 10 kDa cut-off membranes. Selenium species, released by enzymatic hydrolysis of the enriched samples at different levels (50–500 µg Se(IV)), were analysed using three chromatographic methods. In addition, the resulting white wine was also directly analysed by LC-ICP-MS, without applying enzymatic hydrolysis. To simplify data, only the chromatograms obtained after fermentation in the presence of 150 µg of selenite are presented.

3.2.1. Anion-exchange chromatography

Separation of selenium species was performed in a Hamilton PRP-X100 column using 10 mM ammonium citrate, pH 5.0, in 2% methanol as the mobile phase. Under these conditions, a complete separation of selenium standards prepared in aqueous solution, sweet matrix (must) and hydroalcoholic matrix (ethanol medium and white wine) was achieved in 12 min (Fig. 2). The chromatographic profile of selenised white wine both with and without enzymatic hydrolysis (Fig. 3) shows two peaks identified, by their retention time and standard additions, as selenomethionine (4 min) and selenocystine or selenomethionine Se-oxide (SeMetO) (2 min). The peak at 2 min has been identified in previous studies as selenomethionine Se-oxide but this should be confirmed with other chromatographic results. No differences in chromatograms were observed between hydrolysed and non-hydrolysed white wine, suggesting that selenomethionine results in a free Se-species in the wine which is not bound to proteins. As expected, a main peak corresponding to selenomethionine (4–5 min) was detected in the hydrolysed samples from the residual yeast (Fig. 4).

3.2.2. Size exclusion/ion exchange

To confirm the identity of the selenium species found by anion-exchange, separation by using a Shodex-Asahipak GS-220 HQ column was performed. Fig. 5a shows separation of standards of selenium species prepared in white wine. Separation of selenium compounds was achieved in 14 min. The chromatogram obtained after enzymatic hydrolysis of selenised white wine (Fig. 5b) shows a main peak at 12 min, which again matches with the SeMet or SeMetO retention time. However, at the retention time of SeCyst₂ no peak was detected, the presence of selenocysteine was excluded and this indicated that the Se-species which eluted at 2 min on

Table 2

Chromatographic parameters for selenium speciation coupled to ICP-MS.

Parameters	Column		
	Hamilton PRP-X100	Shodex-Asahipak GS-220 HQ	Waters Symmetryshield RP 18
Mechanism	Anionic exchange	Size exclusion/ionic exchange	Reversed phase
Mobile phase	Citric acid 10 mM, MeOH 2% (pH = 5.0)	Ammonium acetate 25 mM (pH = 6.7)	HFBA 0.1%, formic acid 0.1%, cysteine 1 mM, MeOH 2%
Flow	1 ml/min	0.8 ml/min	1 ml/min
Injection volume	100 µl	100 µl	100 µl

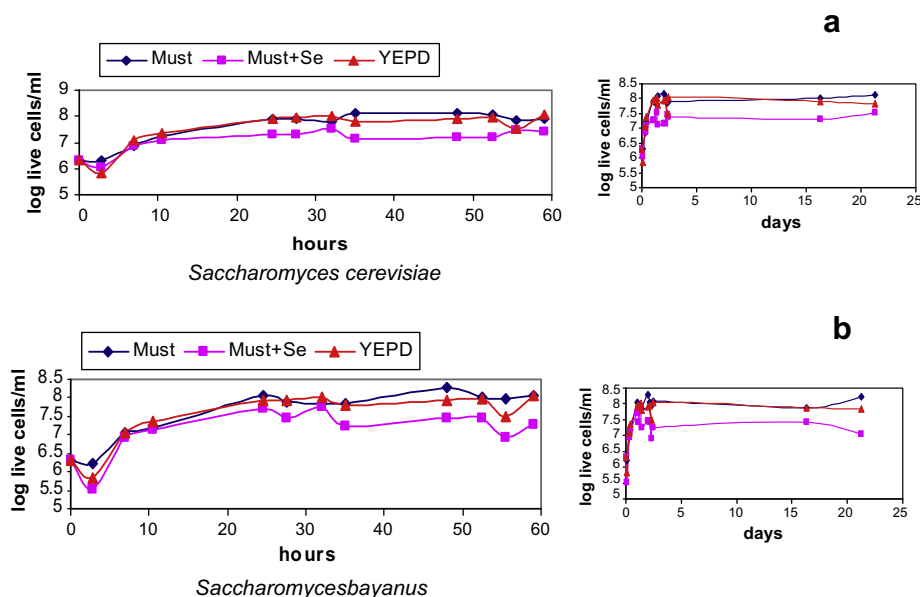


Fig. 1. Growing curves from (a) *Saccharomyces cerevisiae* and (b) *Saccharomyces bayanus* in YEPD medium (red line), must (blue line) and must with selenium (250 µg of Se(IV)) (pink line). (For interpretation of the references in colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

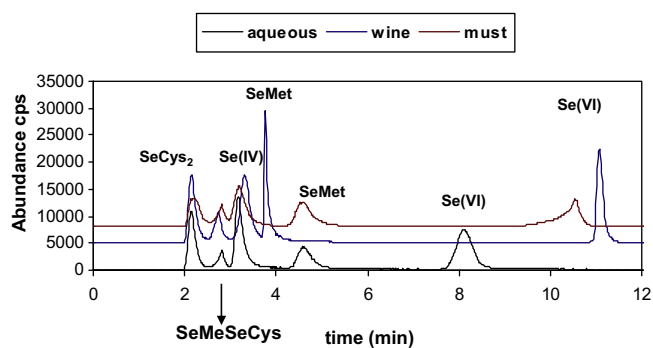


Fig. 2. Separation by anion-exchange chromatograms monitored at Se m/z 82 of a mixture of Se standards containing 150 µg/l of each Se-species prepared in aqueous (black line), white wine (blue line) and must (red line) matrix. (For interpretation of the references in colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

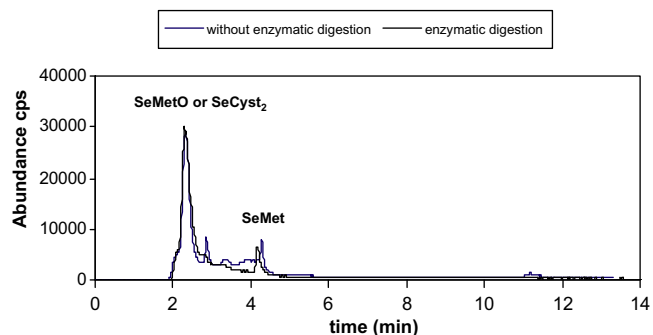


Fig. 3. Separation by anion-exchange chromatograms monitored at Se m/z 82 of Se-enriched (150 µg in 50 ml of grape juice) white wine after 21 days fermentation with (black line) and without (blue line) enzymatic hydrolysis. (For interpretation of the references in colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the anion-exchange column was SeMetO which coelutes with SeMet on the Shodex-Asahipak chromatographic column.

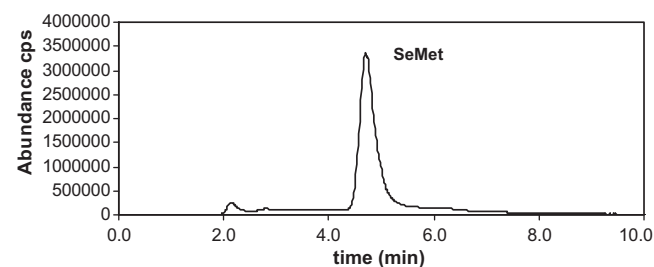


Fig. 4. Anion-exchange chromatogram monitored at Se m/z 82, showing the separation of Se-species on an enzymatic hydrolysed selenised yeast after 21 days fermentation.

3.2.3. Reversed phase

Separation by RP-HPLC using 0.1% heptafluorobutyric acid (HFBA), 0.1% formic acid and 1 mM cysteine in 2% (v/v) methanol as mobile phase was also performed for species separation. Chromatograms from selenium standards added to a wine matrix and selenium species generated in wine during fermentation are shown in Fig. 6a and b, respectively. Peaks observed at 2.5 and 4.5 min in Fig. 6b matched with those of Se(VI) and SeCys₂, respectively, but their absences in the previous chromatographic mechanisms hamper their proper identification. Moreover, spiking experiments with SeCys₂ did not provide an increasing contribution to the chromatographic peak 4.5 min (results not shown). In order to clarify the identity of unknown peaks, the use of selenomethionine Se-oxide would help in the unambiguous identification of the sought Se-species. Unlike results from the Shodex-Asahipak chromatographic column, selenomethionine Se-oxide presents a complex chromatogram (Fig. 6c) composed of three peaks with a similar profile to that obtained from selenised white wine. This clearly corroborates the previous findings obtained by the other two separation mechanisms tested. Selenium methionine (mainly as selenomethionine Se-oxide) is the only selenium present in the manufactured white wine.

The selenium species present in both post-fermentation fractions (residual yeast and white wine) resulting from fermentation in the presence of selenite (50–500 µg range) were quantified by

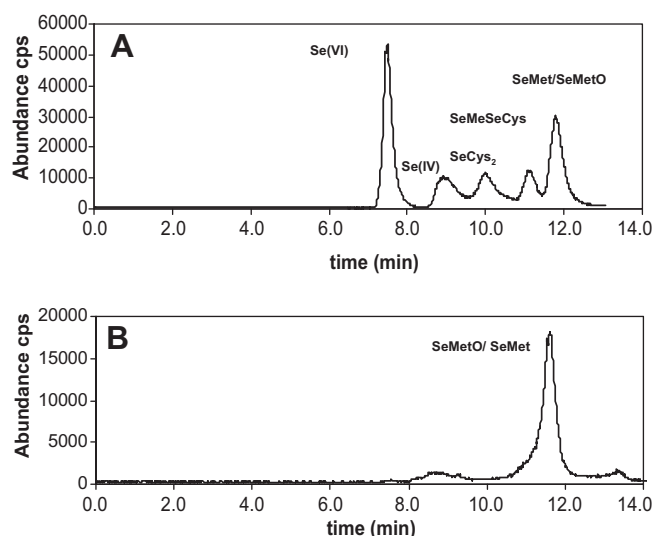


Fig. 5. Ion exchange and molecular exclusion chromatograms monitored at Se m/z 82, showing the separation of: (a) mixture of Se standards containing 150 $\mu\text{g/l}$ of each Se-species prepared in white wine matrix, and (b) enzymatic extraction of Se-enriched (150 μg in 50 ml of grape juice) white wine after 21 days fermentation.

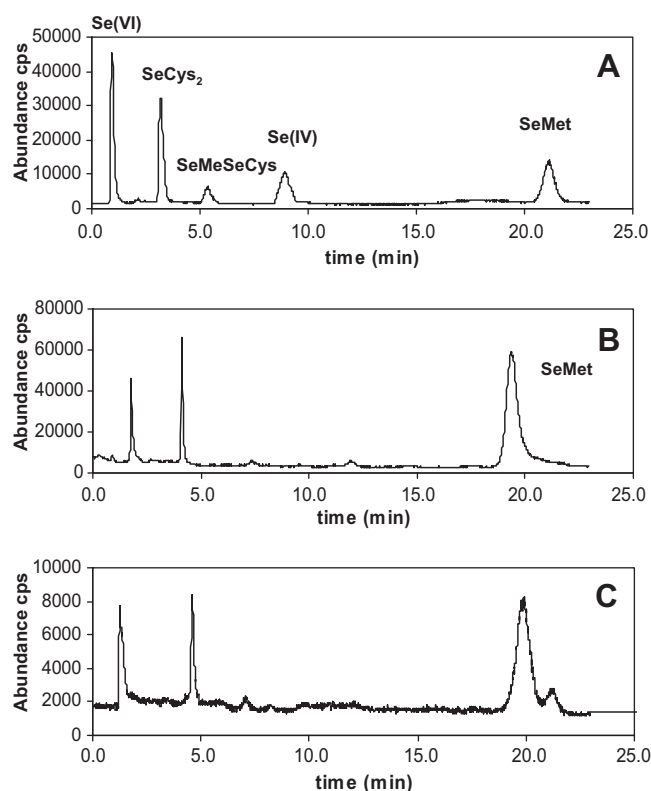


Fig. 6. Reversed-phase chromatograms monitored at Se m/z 82, showing the separation of: (a) mixture of Se standards containing 150 $\mu\text{g/l}$ of each Se-species prepared in white wine matrix, (b) enzymatic extraction of selenised Se-enriched (150 μg in 50 ml of grape juice) white wine, and (c) selenomethionine Se-oxide.

anion-exchange HPLC/ICP-MS using the standard addition method. On average, SeMet accounted for 80% (range 70–90%) of the total selenium found in selenised yeast after enzymatic hydrolysis. However, it was not possible to achieve a proper mass balance in selenised wine (with and without enzymatic hydrolysis), since SeMet accounted only for 1–2% of the total selenium. These results

in selenised wine could be attributed to the presence of high levels of selenomethionine-Se-oxide. Its presence is noteworthy considering its absence in the resulting selenised yeast. This Se compound results from an analytical artefact coming from oxidation of selenomethionine during sample treatment and/or storage. In the present study it could be produced by potential exposure to oxygen during fermentation and storage. The degree of transformation of SeMet into SeMetO is quite unpredictable, leading to erroneous results on quantification.

In any case, detection of both SeMet and SeMetO involves transformation of the initial inorganic Se into selenoamino acids during fermentation. The similarity of the results obtained, both with and without enzymatic hydrolysis, suggests that this selenoamino acid is not associated with peptides or proteins. This could be explained by the low content of proteins in wine. Wine proteins are a mixture of grape proteins and proteins from autolysed yeast, with the majority coming from grape pulp. Most of the must proteins are hydrolysed during the vinification process, by the combination of exocellular protease enzymes and low pH (3.0–3.8), but a few are highly resistant to proteolytic activity being identified as pathogenesis-related (PR) proteins. Wines prepared from different grape varieties or subjected to different vinification procedures are essentially composed of identical sets of PR proteins (Ferreira, Picarra-Pereira, Monteiro, Loureiro, & Teixeira, 2002).

Wine production by alcoholic fermentation, as previously mentioned, has been demonstrated to be compatible with the presence of selenium and is also independent of the type of the *Saccharomyces* used. The type of yeast used slightly affects the efficiency of inorganic selenium biotransformation, which is higher for *S. cerevisiae* than for *S. bayanus*.

From results obtained we could conclude that alcoholic fermentation to produce white wine was compatible with the presence of inorganic selenium at concentrations up to 500 μg in 50 ml. Biotransformation of inorganic selenium during fermentation led to SeMet in the resulting selenised white wine, which was not incorporated into wine proteins and could be considered as merely a transfer of SeMet from yeast to wine during fermentation. The use of three complementary separation mechanisms was mandatory for unambiguous identification/quantification of the selenium species.

Selenised wine can be considered an adequate source of SeMet, species of recognised healthy properties, in the diet. The work presented here could be considered as a first approach for further application to pilot and full-scale vinification process.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Spanish Government for financial support of this study through the project CTQ-2008-05925 and Analisis-II (AGR-1464). M. Sanchez-Garcia would also like to thank the Spanish Government for a doctoral fellowship through the mentioned project.

References

- Alzate, A., Fernández-Fernández, A., Pérez-Conde, C., Gutiérrez, A. M., & Cámara, C. (2008). Comparison of biotransformation of inorganic selenium by *Lactobacillus* and *Saccharomyces* in lactic fermentation process of yogourt and kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8728–8736.
- Combs, G. F., & Gray, W. P. (1998). "Chemopreventive agents: Selenium. *Pharmacology and Therapeutics*, 79, 179–192.
- Cuderman, P., & Stibilj, V. (2009). How critical is the use of commercially available enzymes for selenium speciation? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393, 1007–1013.
- Dietary reference intakes (DRI) (2000). National Research Council (pp. 284–319). Washington: National Academy Press.
- Ferreira, R. B., Picarra-Pereira, M. A., Monteiro, S., Loureiro, V. B., & Teixeira, A. R. (2002). The wine proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 230–239.

- Goldhaber, S. B. (2003). Trace element risk assessment: Essentiality vs. toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 38, 232–242.
- Korhola, M., Vainio, A., & Edelman, K. (1986). Selenium yeast. *Annals of Clinical Research*, 18, 65.
- Pedrero, Z., Ruiz-Encinar, J., Madrid, Y., & Cámara, C. (2007). *Journal of Chromatography A*, 1139, 247–253.
- Ponce de León, C. A., Bayón, M. M., Paquín, C., & Caruso, A. (2002). Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: A study of different incorporation methods. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 602.
- Reference values for nutrient intake (2002). (p. 215). Bonn: German Nutrition Society, Austrian Nutrition Society, Swiss Society for Nutrition Research, Swiss Nutrition Association.
- Reyes, L. H., Moreno Sanz, F., Herrero Espilez, P., Machante-Gayón, J. M., García Alonso, J. I., & Sanz-Medel, A. (2004). Biosynthesis of isotopically enriched selenomethionine application to its accurate determination in selenium-enriched yeast by isotope dilution analysis HPLC–ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19, 1230.
- SFC, 2000. Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Selenium. <http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out80_en.html>.
- World Health Organisation (1996). Selenium. *Trace element in human nutrition and health* (pp. 105–122). Geneva: WHO.

V.1.2. BIOTRANSFORMACIÓN DE SELENITO DURANTE LA ELABORACIÓN DE LA CERVEZA. EVALUACIÓN POR HPLC-ICP-MS.

“Selenite biotransformation during brewing. Evaluation by HPLC-ICP-MS”. *Talanta* (2012), 2088: 272-276.

Este trabajo fue presentado en el “9th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine”, Kioto, Japón. Junio, 2010.



Selenite biotransformation during brewing. Evaluation by HPLC–ICP–MS

Maria Sánchez-Martínez^a, Erik Galvão P. da Silva^b, Teresa Pérez-Corona^a, Carmen Cámara^a, Sergio L.C. Ferreira^b, Yolanda Madrid^{a,*}

^a Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Avda Complutense s/n. 28040 Madrid, Spain

^b Instituto de Química, Universidad Federal da Bahia, Campus Universitário de Ondina, Salvador, Bahia 40170-290, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 June 2011

Received in revised form 11 October 2011

Accepted 16 October 2011

Available online 10 November 2011

Keywords:

Biotransformation

Selenium

Beer

HPLC–ICP–MS

ABSTRACT

Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and lactic bacteria have shown their ability to accumulate and transform inorganic selenium into organo Se compounds. The objective of this work was to evaluate selenium biotransformation during brewing by using *S. cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* for Ale and Lager fermentation, respectively. Se-enriched beer was produced by the addition of sodium selenite (0, 0.2, 1.0, 2.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{g Se mL}^{-1}$, respectively) to the fermentation media composed of yeast, malt extract and water. The alcoholic fermentation process was not affected by the presence of selenium regardless of the type of *Saccharomyces* being used. The percentage of selenium incorporated into beer, added between 1.0 and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ was 55–60% of the selenium initially present. Se-compounds in post-fermentation (beer and yeast) products were investigated by using an analytical methodology based on HPLC–ICP–MS. For this purpose, several sample treatments, including ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis, in conjunction with different separation mechanisms like dialysis and anion exchange HPLC chromatography were applied for unambiguously identifying Se-species that produce during brewing. Selenomethionine was the main selenium compound identified in beer and yeast, being this species in the only case of the former not associated to peptides or proteins.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The importance of selenium (Se) as essential trace element to the human health [1] is recognized and its deficiency related to the occurrence of several diseases [2–6]. Selenium supplementation has been widely applied for increasing selenium status of Se-deficient population, being selenium-enriched yeast supplements which have focused the greatest interest [7]. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and lactic bacteria have shown their ability to accumulate and to transform inorganic selenium into organo-Se compounds (safer and highly bioactive) [8–10]. Fermentation has been used for several authors as a process to prepare Se-enriched food. Alzate et al. [9,10] compared the different selenium species that are produced when lactic fermentation in presence of two different types of microorganisms, LAB (*Lactobacillus*) and yeast (*Saccharomyces*), take place to produce yogurt and kefir, respectively. Selenium species formed depend on the type of microorganism involved in the fermentation process, being selenocystine (SeCys₂) and semethylselenocysteine (MeSeCys) the main species generated by *Lactobacillus* and Selenomethionine (SeMet) by *Saccharomyces*. Recently [11], SeMet was the main selenium-containing amino acid

identified in selenized white wine produced by *S. cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*.

Brewing also involves fermentation in presence of yeast. The basic ingredients of beer are water; a fermentable (convertible into alcohol) starch source, such as malted barley; a brewer's yeast to produce the fermentation; and a flavouring, such as hops. A secondary starch source (an adjunct) may be used, such as maize (corn), rice or sugar. Beers are commonly categorized into two main types, the globally popular pale lager (brewed with bottom-fermenting yeast as *Saccharomyces uvarum*) and the regionally distinct Ale (brewed with top-fermenting yeast, most commonly *S. cerevisiae*).

Research in brewing over the past three decades, has been focused on the application of different fermentation processes mainly to facilitate the beer production and consequently to reduce the production costs [12]. However, to the author's knowledge the direct synthesis of Se-compounds during brewing has never been reported before. Therefore, the aim of the present study is to evaluate whether biotransformation of selenium, added as selenite, occurs during brewing. For this purpose, an analytical methodology based on the use of HPLC–ICP–MS will be optimized. Several sample treatments in conjunction with different separation mechanisms like dialysis and anion exchange HPLC chromatography will be applied for unambiguously identifying Se-species that produce during brewing.

* Corresponding author.

E-mail address: ymadrid@quim.ucm.es (Y. Madrid).

Table 1
ICP-MS instrumental settings and HPLC separation conditions.

ICP-MS instrumental parameters	
Forward power	1250 W
Plasma gas flow rate	15.0 L min ⁻¹
Auxiliary gas flow rate	1.26 L min ⁻¹
Carrier gas flow rate	1.1 L min ⁻¹
Nebulizer type	Meinhard
Spray chamber type Dwell time per point	Scott-double pass 200 ms
Data acquisition mode	Time resolved analysis
Isotope monitored Internal standard	⁷⁷ Se, ⁸² Se ⁷³ Ge
HPLC conditions	
Analytical column	Hamilton PRPX-100 (250 × 4.1 mm)
Mobile phase	10 mM ammonium citrate pH 5
Flow rate	1 mL min ⁻¹
Injection Volume	100 µL

2. Experimental

2.1. Instrumentation

Ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis of samples was carried out in a Sonoplus ultrasonic homogenizer (Bandelin, Germany) equipped with a titanium 3 mm diameter microtip and fitted with a HF generator of 2200 W at a frequency of 20 kHz. Extracts were centrifuged in an Eppendorf centrifuge 5804 F34-6-38 (Germany). Microwave acid digestion was performed in a 1000 W MSP microwave oven (CEM MSP 1000, Matheus, NC).

HPLC–ICP-MS measurements were carried out by using a PU-2080 Plus high pressure pump (JASCO, Japan) for chromatographic separation and a Thermo-X series X7 ICP-MS for elemental specific detection. Anionic exchange separation of selenium compounds was performed on a Hamilton PRP X-100 (Reno, NE). The HPLC column was directly connected to the Meinhard nebulizer of the ICP-MS via PTFE tubing (0.5 mm i.d.). The samples were injected through a six-port Rheodyne 7725i valve fitted with a 100 µL loop. The optimum chromatographic and instrumental parameters for on-line measurements with ICP-MS are summarized in Table 1.

Cell counting was carried out by using a counting chamber Neubauer improved with a, bright-lined Hirschmann Laborgeräte EM, Techcolor (dimensions 0.100 mm depth, 0.0025 mm²) and a microscope (Nikon 71622, 1.25x, Japan).

Fermentation was carried out under sterilized conditions by autoclaving material and solutions at 110 °C for 20 min. Filters of 0.22 µm were used to sterilize standard solutions. Manipulation and transfers were performed in a laminar flow cabinet (Telstar Biostar 16809, air speed 0.38 ms⁻¹, working pressure 132 Pa mm CA).

2.2. Reagents and materials

Selenomethionine (SeMet), selenomethylselenocysteine (SeMetSeCys), and selenocystine (SeCys₂) were purchased from Sigma and dissolved with Milli-Q water with 3% hydrochloric acid for improving dissolution. Solutions of inorganic selenium were prepared by dissolving sodium selenite (Na₂SeO₃) and selenate (Na₂SeO₄), purchased from Merck, in Milli-Q water. These stock solutions were kept in dark at 4 °C. Selenomethionine–Se–oxide (SeMetO) was obtained by oxidation of selenomethionine by using hydrogen peroxide, H₂O₂ (35%) (Merck), and by following the procedure described by Pedrero et al. [13]. The enzymatic hydrolysis was achieved by using a non-specific enzyme, Protease XIV, purchased from Sigma–Aldrich.

Separation of selenium species for anion-exchange chromatography was performed by using 10 mM of citric acid (Sigma) in 2% (v/v) methanol of HPLC grade. All reagents used were of the highest

purity. De-ionized water (18 M Ω cm) was obtained from a Milli-Q water purification system unit.

S. cerevisiae, *S. uvarum* and malt extracts were obtained from “Special Lager” and “West Riding Wheat” home brewing kits, purchased from Micromalta S.L. The commercial beer-making yeasts were microbiologically identified by the Department of Microbiology of Complutense University as a pure culture of *S. cerevisiae* and *S. uvarum*.

2.3. Beer's fermentation

About 0.125 g of rehydrated yeast (equivalent to 9.0×10^6 *S. cerevisiae* cells mL⁻¹ or to 24×10^6 *S. uvarum* cells mL⁻¹ for Ale and Lager fermentation, respectively and 16.3 g of malt extract were placed in 50 mL erlenmeyer flasks and exposed to sodium selenite at a final concentration of 0.2–20 µg mL⁻¹. The resulting solutions were left to ferment for 12 days at 18 °C. After fermentation, selenized beer was separated from yeast by centrifugation at 2057 g for 20 min.

2.4. Total selenium determination by ICP-MS

The post-fermentation products, i.e. residual yeast and selenized beer were digested with 2.5 mL of concentrated nitric acid in an analytical microwave oven. The resulting solutions were then diluted to 25.0 mL with deionized water prior to their analysis for total selenium by ICP-MS. In addition, selenium concentration was determined in commercial beers of different brands to establish baseline Se levels. Total selenium was quantified by both external and standard addition calibrations of the signal obtained by ICP-MS following the experimental conditions summarized in Table 1. Analytical peaks were evaluated as peak area.

2.5. Dialysis

About 5 mL of Se-enriched beer were dialysed. The dialysis process was performed for 20 h at 4 °C against Milli-Q water using dialysis membranes with 3.5 kDa molecular weight cut-off. During this period the Milli-Q water was changed twice.

2.6. Selenium species determination by HPLC–ICP-MS

The extraction of Se compounds from post-fermentation products was performed by ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis by using our procedure as described elsewhere [11]. In brief, 5 mL of beer or 0.200 mg of yeast were placed in an Eppendorf tube and 3 mL of deionized water and 20 mg of Protease XIV were then added. Sample hydrolysis was performed at 37 °C for 2 min sonication. The extracts were centrifuged at 7500 × g for 20 min by using a 10 kDa cut-off filter. Finally, the supernatants were appropriately diluted prior to their analysis for selenium speciation. Identification of selenium species were done by comparing the retention time and spiking experiments. Blanks analysis were performed to evaluate the occurrence of selenium species (Se(VI) and SeMet) from impurities in the protease used for sample extraction [14]. Selenium species quantification was performed by standard addition calibration of the signal obtained by HPLC–ICP-MS following the experimental conditions summarized in Table 1. Analytical peaks were evaluated as peak area.

2.7. Validation of the method

In the present study a certified reference material is employed in order to validate the methodologies used. Method validation was performed by using the certified reference material SELM-1 (Se-yeast, certified for total selenium (2059 ± 64 mg kg⁻¹))

Table 2

Results for the determination of total selenium concentration in beers of different trademarks using ICP-MS ($n = 3$).

Sample (trademark)	Se ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Mahou	12.8 ± 1.2
Amstel	17.2 ± 1.3
Heineken	12.5 ± 1.1
Bucker (0% alcohol)	9.2 ± 1.2
Paulaner	14.2 ± 2.0

and selenomethionine ($3389 \pm 173 \text{ mg kg}^{-1}$) from NRCC, Ottawa, Canada).

3. Results and discussion

3.1. Selenium concentration in commercial beers

Total selenium concentration was determined in different trademarks beers by ICP-MS following the procedure given above. Detection and quantification limits were calculated as the concentration equivalent to three and ten times the standard deviation of blank measurements ($n = 10$), respectively. Detection and quantification limits were $0.001 \mu\text{g L}^{-1}$ and $0.004 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively.

As shown in Table 2, the concentration of selenium found was quite low (ppb level) and similar between all branches tested.

3.2. Beer production in presence of increasing selenite concentration

We have recently demonstrated that the addition of selenium (as Se(IV)) before fermentation, up to a final concentration of $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ to produce white wine [11] does not affect the efficiency of the alcoholic fermentation process. Based on these previous results, brewing was carried out in the presence of Se(IV) (added as Na_2SeO_3) within the range 0.2 – $20 \mu\text{g Se mL}^{-1}$. After 12 days of brewing, selenium concentration was determined in the Se-beer by ICP-MS. For this purpose, two different sample treatment procedures were applied: microwave acid digestion and enzymatic probe sonication. Besides, beer was analysed without applying any pre-treatment.

The total selenium found in selenized beer after fermentation in presence of increasing selenite concentration is compiled in Table 3. The percentage of selenium incorporated into beer was about 55–60% of the level of selenium initially added (from 1.0 to $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ of Se(IV)). In contrast, increasing the Se concentration to around $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ resulted in a decrease in this percentage (to around 30%). The results obtained were independent on the type of yeast used to make beer: the top-fermenting *S. cerevisiae* and bottom-fermenting *S. Uvarum*. Table 4 summarizes comparative results obtained for Se content in Se-beer by the application of different sample treatments suggesting that selenium is not associated with peptides or proteins.

Table 3

Total selenium in selenized beer after 12 days Ale-fermentation ($n = 3$).

Se (IV) added ($\mu\text{g Se mL}^{-1}$)	Se in selenized beer ($\mu\text{g Se mL}^{-1}$)	% Se
0.2	0.086 ± 0.003	43 ± 5
1.0	0.61 ± 0.08	61 ± 3
2.0	1.1 ± 0.4	55 ± 4
10.0	6.0 ± 0.7	60 ± 7
20.0	6.0 ± 0.5	30 ± 5

Table 4

Results for the determination of total selenium concentration in selenized beer using ICP-MS after application of different sample treatments ($n = 3$).

Selenium added ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Acid digestion by MW ($\mu\text{g Se mL}^{-1}$)	Enzymatic hydrolysis by USP ($\mu\text{g Se mL}^{-1}$)	Without treatment ($\mu\text{g Se mL}^{-1}$)
0.2	0.086 ± 0.004	0.084 ± 0.003	0.083 ± 0.002
1.0	0.61 ± 0.02	0.64 ± 0.03	0.60 ± 0.07
10	6.0 ± 0.7	5.8 ± 0.6	6.3 ± 0.7

Table 5

Percentage of biotransformation in selenized beer after dialysis ($\text{MW} > 3.5 \text{ kDa}$) ($n = 3$).

Selenium added ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	[Se]/ $\mu\text{g mL}^{-1}$ in selenized beer	[Se]/ $\mu\text{g mL}^{-1}$ in selenized beer after dialysis	% Se
0.2	0.086 ± 0.004	0.008 ± 0.004	10 ± 7
1.0	0.61 ± 0.02	0.060 ± 0.004	10 ± 1
10	6.0 ± 0.7	0.70 ± 0.01	12 ± 1

3.3. Selenite biotransformation during fermentation

As a first step to a fast evaluation of whether inorganic selenium has been biotransformed during fermentation process, Se-enriched beer was dialysed through a 3.5 kDa molecular weight cut-off membrane. The results obtained shown that 88% of the Se content transversed the membrane and emerged in the dialysate outside the bag. This evidence that only a minor amount (around 10%) of the Se(IV) incorporated into beer was converted to compounds with a molecular weight higher than 3.5 kDa (Table 5). Although dialysis is a valuable analytical tool for screening biotransformation processes, however, dialysis also involves hydrophobic interactions, which could keep compounds less than the pore size from crossing.

For a better understanding of the process, anion exchange HPLC–ICP-MS previous ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis was used for selenium speciation in post-fermentation products, using our procedure as described above. Besides, Se-beer was analysed by LC–ICP-MS without applying any pre-treatment.

A HPLC–ICP-MS chromatogram of an enzymatic extract of Se-beer obtained by ultrasonic probe sonication under conditions given in Table 1 is shown in Fig. 2. The presence of two major peaks that matched with the retention time of SeMet oxidation product and SeMet standard (Fig. 1) were detected. Comparative Se profiles (Fig. 2) were obtained with and without application of enzymatic hydrolysis. These results are in agreement with those obtained in the above dialysis study and strongly support that selenium in Se-beer is mainly present as free selenomethionine. As expected, a main peak corresponding to selenomethionine (4 – 5 min) was detected in the enzymatic extract of residual yeast (Fig. 3). Unlike beer, Se-yeast provides different Se profiles, dependent on the type

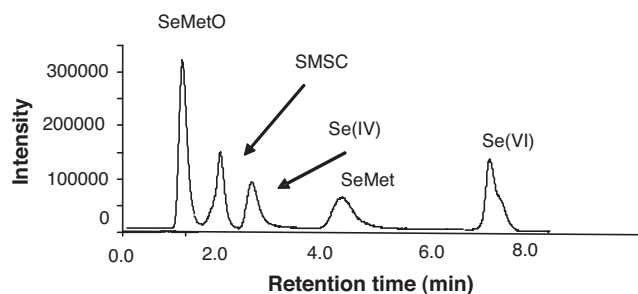
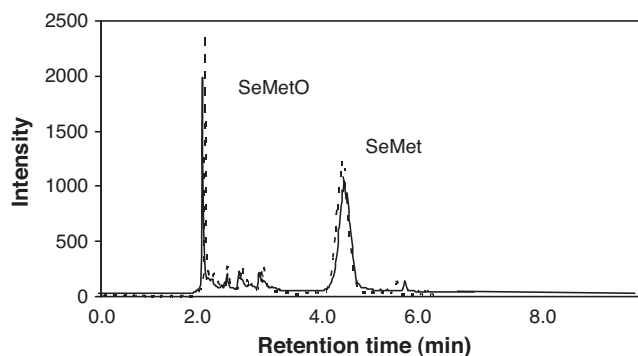


Fig. 1. Separation of a mixture of Se standards containing $150 \mu\text{g L}^{-1}$ of each Se species by anion exchange-HPLC–ICP-MS. Chromatograms were monitored at $\text{Se } m/z 82$.

Table 6Quantification of SeMet by anion exchange HPLC–ICP–MS in post Ale-fermentation fractions ($n = 3$).

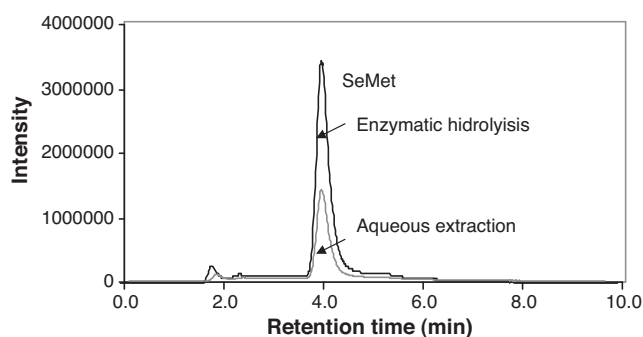
Se-beer				Se-yeast			Se-(beer + yeast)		
Se added ($\mu\text{g Se mL}^{-1}$)	Se found ($\mu\text{g Se mL}^{-1}$)	SeMet ($\mu\text{g Se mL}^{-1}$)	%R	Se found ($\mu\text{g Se mL}^{-1}$)	SeMet ($\mu\text{g Se mL}^{-1}$)	%R	Se found ($\mu\text{g Se mL}^{-1}$)	SeMet ($\mu\text{g Se mL}^{-1}$)	%R
0.2	0.086 ± 0.004	ND	–	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.01	92 ± 5	0.20 ± 0.05	0.19 ± 0.02	95 ± 5
1.0	0.61 ± 0.02	0.006 ± 0.003	1.0 ± 0.2	0.48 ± 0.05	0.46 ± 0.03	96 ± 8	1.10 ± 0.02	1.05 ± 0.01	95 ± 5
10	6.0 ± 0.7	0.12 ± 0.01	2.0 ± 0.3	4.0 ± 0.1	3.6 ± 0.1	90 ± 4	9.8 ± 0.2	10.3 ± 0.2	105 ± 3

 R calculated as sum of species related to total selenium found.**Fig. 2.** Separation of Se-enriched ($10 \mu\text{g Se mL}^{-1}$) beer by anion exchange HPLC–ICP–MS after 12 days Ale fermentation (A) with (dashed line) and (B) without enzymatic (straight line) hydrolysis. Chromatograms were monitored at Se m/z 82.

of sample treatment used. These results are consistent with those appearing in the literature indicating that selenium in Se-yeast is mainly present in the form of SeMet, but in this case associated with peptides or proteins. It is also interesting to note that Se-compounds produced during brewing were not dependent on the type of the commercial beer-making yeast, and therefore the type of fermentation, i.e. Lager (brewed with bottom-fermenting yeast as *S. uvarum*) and Ale (brewed with top-fermenting yeast as *S. cerevisiae*) fermentation.

3.4. Selenomethionine quantification

Selenomethionine in the final products after Ale fermentation in presence of 0.2, 1.0 and $10 \mu\text{g Se mL}^{-1}$ was quantified by anion exchange HPLC–ICP–MS by using the standard addition method. Detection and quantification limits for SeMet were $0.7 \mu\text{g L}^{-1}$ and $2.2 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The total Se content of such products was also determined for mass balance purposes. The quality assurance procedures for these analyses included the measurement of a Se-yeast reference material CRM SELM-1 for total selenium and

**Fig. 3.** Separation of residual selenized yeast by anion exchange HPLC–ICP–MS with and without previous enzymatic hydrolysis. Fermentation period: 12 days. Chromatograms were monitored at Se m/z 82.

SeMet concentration. Since, at the 95% confidence level, no significant differences were detected between the certified values and the experimental ones, the method used was considered accurate for total selenium and SeMet determination.

As yeast is usually present in Ale beers, Se-Ale beer was analysed with and without separation of the yeast phase. As it can be observed in Table 6, SeMet concentration in the enzymatic extracts of both Se-Ale beer (without prior removal of yeast) and residual Se-yeast samples is about 95–105% of the total selenium concentration in the samples. However, the results were not as expected when SeMet was quantified in the enzymatic extract of Se-Ale beer previous separation of the yeast-phase. In this case, a proper mass balance was not achieved since SeMet accounted only 1–2% of the total selenium found. As it was previously mentioned, the HPLC–ICP–MS chromatogram obtained from an enzymatic extract of Se-beer (after yeast removal) showed the presence of a major peak that matched with the retention time of SeMet oxidation product. SeMet-oxide could be randomly produced during brewing and/or extraction step and sample storage, makes it difficult to achieve a proper mass balance. In any case, detection of both SeMet and SeMetO involves transformation of selenite into seleno amino acids during fermentation. Despite this problem, suitable results were obtained for Se-yeast and Se-Ale beer samples by using the proposed methodology, demonstrating its suitability for selenium speciation in beer samples.

4. Conclusions

In this study, biotransformation of selenium, added as selenite, during brewing has been shown. For this purpose, an analytical methodology based on the use of several sample treatments in conjunction with different separation mechanisms as dialysis and anion exchange-HPLC was optimized for evaluating Se-biotransformation during brewing. The proposed methodology allow us to identify and quantify total selenium and selenomethionine in the products obtained after brewing (yeast and beer) at the low $\mu\text{g L}^{-1}$ levels. Method validation was achieved by measurement of Se-yeast reference material SELM-1.

The results presented here have evidenced selenite biotransformation during brewing by using either Lager or Ale fermentation. The administration of sodium selenite in the dosage of 1.0 – $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ is suitable for brewing without altering the fermentation capabilities of both *S. cerevisiae* and *S. uvarum*. Biotransformation of inorganic selenium during fermentation leads in the resulting selenized beer to SeMet which seems not to be incorporated into proteins. The results from Se-beer also demonstrated that SeMet is easily oxidized to SeMetO. SeMet randomly transformed to SeMetO by factors inherent to the medium makes it difficult to achieve a proper mass balance. Brewing is an additional example how yeast is able to transform inorganic selenium to organo-Se compounds (SeMet), safe and highly bioactive from the nutritional point of view.

Acknowledgements

The Complutense University group thanks to the Spanish Commission of Science and Technology (CTQ-2008-05925) and the Comunidad Autónoma of Madrid (Spain) and European funding from FEDER programme (project S2009/AGR-1464, ANALISYC-II). M. Sanchez-Garcia would also like to thank the Spanish Government for a doctoral fellowship through the (CTQ-2008-05925) project. Erik Galvão P. da Silva is grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Núcleo de Excelência em Química da Bahia, for providing grants, fellowships and financial support. The authors want to thank to Lluís Benet Fité and Jaume Lluís Tarter from Mahou-San Miguel brewery group for technical support, assistance and valuable comments.

References

- [1] Z. Pedrero, Y. Madrid, *Anal. Chim. Acta* 634 (2009) 135.
- [2] M.G. Boosalis, *Nutr. Clin. Pract.* 23 (2008) 152.
- [3] I. Lu, A. Holmgren, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 723.
- [4] M.P. Rayman, *Lancet* 356 (2000) 233.
- [5] F.P. Bellinger, A.V. Raman, M.A. Reeves, M.J. Berry, *Biochem. J.* 422 (2009) 11.
- [6] L. Latreche, L. Chavatte, *Met. Ions Biol. Med.* 10 (2008) 731.
- [7] Á. Suhajda, J. Hegóczki, B. Janzso, I. Pais, G. Vereczkey, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 14 (2000) 43.
- [8] G.N. Schrauzer, *J. Nutr.* 130 (2000) 1653.
- [9] A. Alzate, B. Cañas, S. Perez-Munguía, H. Hernandez-Mendoza, C. Perez-Conde, C. Cámara, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 9776.
- [10] A. Alzate, A. Fernández-Fernández, C. Pérez-Conde, A.M. Gutiérrez, C. Cámara, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 8728.
- [11] M.T. Pérez-Corona, M. Sánchez-Martínez, M.J. Valderrama, M.E. Rodríguez, C. Cámara, *Y. Madrid, Food Chem.* 124 (2011) 1050.
- [12] C.W. Bamforth, *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 1371.
- [13] Z. Pedrero, J.R. Encinar, Y. Madrid, C. Cámara, *J. Chromatogr. A* 1139 (2007) 247.
- [14] P. Cuderman, V. Stibilj, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 1007.

V.1.3. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PAN ENRIQUECIDO EN SELENOMETIONINA A ESCALA DE LABORATORIO. BIOACCESIBILIDAD DEL SELENIO.

“Preparation and characterization of a laboratory scale selenomethionine-enriched bread. Selenium bioaccessibility”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Enviado.

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

**Preparation and Characterization of a Laboratory Scale
Selenomethionine-enriched Bread. Selenium
Bioaccessibility.**

Journal:	<i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i>
Manuscript ID:	jf-2014-01490q.R1
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	03-Jul-2014
Complete List of Authors:	Sanchez-Martinez, Maria; Universidad Complutense de Madrid, Facultad Quimica. Quimica Analitica Perez-Corona, Maria Teresa; Universidad Complutense de Madrid, Facultad Quimica. Quimica Analitica Cámara, Carmen; Universidad Complutense de Madrid, Facultad Quimica. Quimica Analitica Madrid, Yolanda; Universidad Complutense de Madrid, Quimica Analitica

SCHOLARONE™
Manuscripts

1 **Preparation and Characterization of a Laboratory Scale Selenomethionine-**
2 **enriched Bread. Selenium Bioaccessibility.**

3 María Sánchez-Martínez, Teresa Pérez-Corona, Carmen Cámara and Yolanda Madrid*

4 Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Science, Complutense
5 University of Madrid. Av. Complutense s/n, 28040, Madrid, Spain.

6 *Corresponding author:

7 E-mail: ymadrid@ucm.es

8 Phone: 34 91 3945145

9 Fax: 34 91 3944321

10

11 TITLE RUNNING HEADER: **Characterization of a Laboratory Scale Se-enriched**
12 **Bread.**

Abstract

This study focuses on the preparation at laboratory scale of homogeneously enriched selenomethionine white and wholemeal bread rolls, using selenized yeast. Selenium was supplemented by 1) adding selenite directly to the dough or 2) using selenium-enriched yeast prepared in the laboratory. Optimum yields of selenium-enriched bread were obtained with fresh selenium-enriched yeast. The optimum incubation time for selenomethionine-enriched yeast preparation with minimum uncontrolled production of selenium-intermediates products was 96 hours. Total selenium content was $1.28 \pm 0.02 \mu\text{g g}^{-1}$ and $1.16 \pm 0.02 \mu\text{g g}^{-1}$ in Se-white and wholemeal bread, respectively. Selenomethionine was the main species found accounted for *ca.* 80% of total selenium after separation and quantification by HPLC post-column isotope dilution analysis (IDA)-ICP-MS. Bread homogeneity after hand-kneading and mechanical-mixing of the ingredients was also analyzed, concluding that components have to be mixed mechanically. The bioaccessibility of selenium in Se-enriched bread was $100 \pm 3\%$ and $40 \pm 1\%$ for white and wholemeal bread, respectively.

Keywords

Selenium, selenium enriched-bread, yeast, biotransformation, baking, bioaccessibility

32 Introduction

33 Selenium (Se) is an essential trace element for humans. Supplementation of Se at
34 supranutritional doses when selenium status is under the optimum value, can prevent or
35 reduce different types of tumors, ¹ e.g., lung, kidney, pancreas, or prostate cancer,
36 however the role of selenium in cancer prevention is not well understood yet and should
37 be carefully examined to establish whether supplementation is advisable for treatment
38 or prevention of a specific disease. Se deficiency can affect immune and reproductive
39 systems and thyroid function and is associated to the occurrence of Keshan and
40 Kaschin-Beck diseases. ² The main source of Se in humans is through the diet, however,
41 the recommended dietary allowance (RDA) of this element has not been clearly
42 established yet, because its requirement is highly dependent on several factors such as
43 age, gender, eating patterns, country, etc. ³ The United Kingdom Expert Group on
44 Vitamins and Minerals ⁴ set RDA in 60 and 70 µg/day for women and men,
45 respectively, while the Spanish Agency of Food Security and Nutrition ⁵ set it in 55
46 µg/day for women, and 70 µg/day for men.

47 In areas where Se concentration in soil is low or its viability is poor, its content in
48 cereals and vegetables is also low and consequently the intake by the population is
49 below the RDA. ^{6,7} To prevent Se deficiency two main strategies have been used:
50 development of Se-enriched food and agronomic biofortification of crops by using Se-
51 fertilizers. Several Se-enriched foods such as wine ⁸, beer ⁹, yogurt ¹⁰, or sauerkraut ¹¹
52 have been developed in the last years. However, biofortification of crops with selenium
53 through foliar and soil application has been the most widely technique used. ¹²⁻¹⁸
54 Biofortification is a laborious and expensive process, being wheat the main cereal
55 chosen for performing this agronomic practice. This is because wheat-based foods are
56 important elements of the Mediterranean diet. These foods contain a high number of

important nutritional ingredients such as minerals, carbohydrates, vitamins, etc., with properties relevant for human health.¹⁷ Although bread consumption has declined in the last years as a result of changing eating patterns,^{5,19} it is still one of the most important parts of the diet in countries such as Spain, Italy, and Greece²⁰ and it is the second most important source of Se in the United States²¹ with selenomethionine (SeMet) as the predominant selenium species.^{22,23} Wheat from North America and Canada, with high Se concentrations,²⁴ was imported to Europe until the mid-70s,²⁵ but nowadays, since regional wheat is being more and more used, a decrease of Se intake has been observed among the general population.

The aim of this work is to elaborate lab-scale Se-enriched bread by using laboratory-made selenized yeast during the manufacturing step, skipping the biofortification of wheat, in a faster, cheaper, and easy procedure. Evaluation of Se biotransformation and stability of the species during baking, as well as the optimization of selenized yeast production were carried out. Quantification of Se-species was performed by species-unspecific or post-column mode of IDA, which allows the quantification of unknown or known species when the enriched standard is not available.²⁶ Homogeneity studies of bread elaboration were also performed to find out which is the most suitable technology to prepare Se-enriched bread. Finally, Se bioaccessibility in the resulting Se-rich white and wholemeal bread was assessed by applying an *in vitro* digestion method. The main novelty of the current study involves a rigorous control of all the variables affecting the preparation of Se-enriched bread with the aim of facilitating the migration of the process from the lab-scale to the industrial or commercial scale. The results obtained about selenium bioaccessibility in white and whole bread are also of a great interest from the nutritional point of view.

82 **Materials and methods**

83 ***Chemicals***

84 Chemicals and reagents were of analytical grade and solutions were prepared with
85 deionized water (18 M Ω cm) from a Milli-Q water purification system unit (Millipore,
86 USA). Stock standard solutions of selenomethionine (SeMet), seleno
87 methylselenocysteine (MeSeCys), and selenocystine (SeCys₂), purchased from Sigma-
88 Aldrich (Germany) were prepared by dissolving each in 3% hydrochloric acid (37%,
89 Merck, Germany). Inorganic Se solutions were prepared by dissolving sodium selenite
90 (Na₂SeO₃) and selenate (Na₂SeO₄), purchased from Merck (Germany), in 2% HNO₃
91 (60%, Sharlau, Spain). Stock solutions were stored at 4°C and working solutions were
92 prepared daily by dilution. Selenomethionine-Se-oxide (SeMetO) was obtained by
93 oxidation of a SeMet standard using hydrogen peroxide (35%, Panreac, Spain).

94 Culture medium for yeast was Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD) composed of
95 1% of yeast extract (Sigma, Germany), 2% glucose (Fluka, Germany), and 2% peptone
96 water (10 mM peptone from Sigma, Germany; 5 M NaCl from Merck, Germany; at pH
97 7.2).

98 Acid digestion of samples was carried out with HNO₃ and H₂O₂. For gastrointestinal
99 simulated digestion, α -amilase (Merck, Germany), NaHCO₃ (Sigma, Germany), an
100 intestinal solution (1.5% of porcine pancreatin from Merck, Germany; 0.15 % of biliary
101 salts from Sigma, Germany; and 0.15 M NaCl) and gastric solution (6% porcine pepsin
102 from Merck, Germany; 0.15 M NaCl at pH 1.8 adjusted with 2M HCl) were used.

103 Enzymatic hydrolysis was performed by using a non-specific enzyme, protease XIV,
104 from *Streptomyces griseus* (Sigma, Germany). Tris-HCl solution was prepared with
105 Trizma base (Fluka, Germany) dissolved in water and the pH was adjusted at 7.5 with
106 HCl.

107 The ^{77}Se -enriched standard (Cambridge Isotope Laboratories, USA) was purchased as a
108 powder and dissolved in a minimum volume of sub-boiled HCl and diluted to the
109 corresponding final volume with Milli-Q water. The resulting ^{77}Se -enriched solution
110 was used to perform quantification of total Se and Se-species.

111 Se species separation by anionic-exchange chromatography was achieved by using 10
112 mM citric acid (Sigma, Germany) in 2% MeOH (99.9%, Scharlau, Spain) adjusted to
113 pH 5 with ammonium hydroxide (Fluka, Germany) as the mobile phase. The mobile
114 phase for reversed-phase chromatography was 0.1% trifluoroacetic acid, TFA (Sigma-
115 Aldrich, Germany) in 2 % MeOH. The mobile phase for size exclusion chromatography
116 (SEC) was 50 mM Tris-HCl and 0.05 mM KCl (Fluka, Germany) at pH 6.8.

117 The ingredients (white wheat and wholemeal flour and yeast) for manufacturing the
118 bread rolls were purchased from a traditional bakery in Madrid, Spain. Se-enriched
119 yeast certified reference material (CRM) SELM-1 (NRCC, Canada) was used for
120 quality assurance.

121

122 ***Instrumentation***

123 For baking elaboration, dough was fermented in an incubator (Heraeus D-6450,
124 Germany) followed by baking in a thermostatic oven (Digitronic, JP Selecta, Spain).

125 Yeast selenization was performed in an Optic Ivymen System provided with a constant
126 temperature incubator shaker (Comecta S.A., Spain). For homogeneity studies
127 ingredients were mixed in a V-shaped laboratory mixer (Venus FTLMV, Filtra, Spain).

128 For total selenium analysis, samples were digested in an analytical microwave oven
129 (CEM, Matthews, USA). By the other hand, enzymatic hydrolysis was performed using
130 a Sonoplus ultrasonic homogenizer (Bandenlin, Germany) fitted with a titanium 3 mm

131 diameter microtip and a GM200 HF generator. Extracts from enzymatic hydrolysis were
132 centrifuged in an Eppendorf centrifuge 5804 R F34-6-38 (Germany).

133 Elemental detection was carried out using an ICP-MS (Agilent HP-7700 Series, USA)
134 equipped with an octopole reaction cell for monitoring ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{79}Br , ^{80}Se , ^{81}Br ,
135 ^{82}Se and ^{83}Kr isotopes. Argon-based polyatomic interferences were reduced using H_2 as
136 the cell gas at an optimized flow rate of 4.5 mL min^{-1} . A commercial Meinhard
137 nebulizer was used for sample introduction under standard plasma conditions.

138

139 Chromatographic separation was performed with a high-pressure pump (Jasco PU-2089,
140 Italy) fitted with a six-port sample injection valve (Rheodyne 7725i, Rohnert Park, USA)
141 with a 100 μL loop. Different columns were coupled to ICP-MS for speciation analysis:
142 anionic exchange PRP-X100 (250 x 4.1 mm, 10 μm) (Hamilton, Switzerland); reversed-
143 phase ion pairing C8 Zorbax $\text{R}_x\text{-C}_8$ (250 x 3.0 mm, 5 μm) (Agilent, USA); and SEC
144 BioBasic-Sep 60 from 0.1 to 6 kDa (300 x 7.8 mm, 5 μm) (Thermo Fisher, Spain).

145

146 ***Methods***

147 *Preparation of Se-enriched bread*

148 Bread rolls of around 3 x 3 x 3 cm were prepared at laboratory scale. For that purpose,
149 5.00 g of flour (wheat or wholemeal flour), 0.10 g of sodium chloride, 0.15 g of yeast
150 (fresh or lyophilized), and 2.5 mL of deionized water were used, as described in the
151 literature ^{13,27}. In order to have bread rolls with approximately $1 \mu\text{g g}^{-1}$ of Se, 5 μg of
152 selenium were added as sodium selenite. Se supplementation was carried out by two
153 different ways: 1) adding the selenite solution directly to the dough and 2) using Se-
154 enriched yeast. Ingredients were mechanically mixed during 10 minutes and the dough

155 was hand kneaded. Temperature and time of fermentation for dough rising, and baking
156 were optimized; the optimum conditions were 20 min of dough fermentation at 30 °C in
157 an incubator, followed by baking at 200 °C for 25 min in a thermostatic oven . When
158 selenium was directly added to the dough, fermentation times were increased until 24 h
159 in order to allow yeast to biotransform selenium. Once the baking process was finished,
160 bread rolls were cooled at room temperature. Se-enriched bread was lyophilized,
161 minced, and kept at -80 °C until analysis. When selenite was directly added to the
162 dough, it was incorporated to the water and mixed with all the ingredients. Control
163 bread rolls were elaborated following the same procedure as the Se-enriched bread but
164 without Se.

165

166 *Saccharomyces cerevisiae* was cultivated and shaken in an incubator shaker in sterile
167 conditions, using a volume of 2.5 mL of YEPD at 28 °C for 16, 72, and 96 h to achieve
168 the highest incorporation of Se.^{8,28, 29} Sodium selenite was added at the beginning of
169 the process in the amount necessary to reach 1 µg g⁻¹ of Se in the resulting bread rolls.

170

171 *Total Se determination by IDA-ICP-MS*

172 Total Se content was determined by IDA-ICP-MS after acid digestion of the samples
173 (raw ingredients and final baking products) in an analytical microwave oven at 130 °C
174 for 15 min with a ramp temperature of 10 min following the conditions previously
175 described.³⁰ The appropriate amount of ⁷⁷Se spike solution, 1.00 mL of nitric acid, and
176 0.25 mL of hydrogen peroxide were added to 0.15 g of yeast and 0.10 g of bread,
177 dough, or flour. Acid digestion extracts were diluted to 10.00 mL with Milli-Q water
178 and measurements were performed by IDA-ICP-MS

179 To apply IDA-ICP-MS, isotope intensities were corrected using a detector dead time of
180 30 ns. The interferences caused by SeH^+ were corrected with a Se factor (f_{Se}) ranging
181 between 2.2-2.4% of the Se signal, which is in agreement with other authors.^{31,32} Since
182 interferences of bromine were not detected, its correction was not necessary. Next, mass
183 bias in $^{78}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ and $^{80}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ isotope ratio was corrected by the exponential model.³²
184 Mass bias discrimination was computed every five analyses and a mass bias factor (K)
185 of *ca.* - 4% per mass unit, similar to those reported before,^{14,31} was obtained. Se
186 concentration was calculated using the IDA equation described by García-Alonso *et*
187 *al.*²⁶

188

189 *Determination of Se species by HPLC coupled to post-column IDA-ICP-MS*

190 Se speciation in the proteolytic extracts of the raw ingredients and baking products was
191 carried out by HPLC-IDA-ICP-MS by using species-unspecific mode. Enzymatic
192 hydrolysis was performed by adding 30 mg of protease XIV and 3.0 mL of 30 mM Tris-
193 HCl solution (pH 7.5) to 0.15 g of yeast and 0.10 g of bread, dough, or flour. The
194 resulting extracts were centrifuged for 20 min at 10233 rpm and supernatants were
195 filtered through a 0.22 μm nylon filter. A comparative study of Se-species extraction
196 methodologies was carried out using microwave-assisted extraction (MAE) (37 °C, 30
197 min), incubation in a thermostatic bath (37 °C, 24 h) and ultrasonic probe sonication (37
198 °C, 2 minutes). Also, acid hydrolysis with diluted HCl was used as an alternative for
199 enzymatic extraction.³³ For Se-species determination, samples were diluted in the
200 corresponding mobile phase. Different chromatographic separation mechanisms were
201 used for Se speciation, anionic exchange PRP-X100, reversed-phase ion pairing C8
202 Zorbax $\text{R}_x\text{-C}_8$ and SEC BioBasic-Sep 60 from 0.1 to 6 kDa. Identification of Se-species

was carried out by matching retention times and by spiking experiments. A reference material SELM-1 of Se-yeast was used for the validation of the procedure. The extraction yield was calculated by comparing the total Se determined after acid digestion and the sum of Se-species quantified after HPLC-IDA-ICPMS measurements. A blank analysis was performed to determine the presence of Se species, such as Se (IV), SeMet, and Se (VI), in the protease used for sample hydrolysis. Quantification of Se species was carried out by post-column IDA-ICP-MS. For this purpose, a ^{77}Se -enriched standard solution of the appropriate known concentration was added, at a constant rate (0.1 mL min^{-1}), through a T piece placed at the end of the column. After equilibration, the resulting mixture was nebulized into the plasma. The conventional intensity chromatograms (counts s^{-1}) were converted to mass flow chromatograms (ng min^{-1}), based on the on-line isotope dilution equation,²⁶ and the same corrections as in conventional IDA-ICP-MS were applied. Area integration was used to obtain the amount of Se in each chromatographic peak.

217

218

219 *Simulated gastrointestinal digestion: Se bioaccessibility*

220 The bioaccessible fraction represents the maximum concentration of elements soluble in
221 gastrointestinal media available for absorption, while bioaccessibility is the percentage
222 of the element present in that fraction in relation with the total content in the sample.³⁰
223 In this paper the *in vitro* gastrointestinal method described in Luten *et al.*³⁴ was
224 modified and adapted to the lyophilized bread roll samples. Briefly, approximately 1.00
225 g of the dried sample and 5.0 mL of water containing 5 mg of α -amylase were mixed by
226 shaking for 1 min and incubated for 15 min at 37 °C. Next, 3.0 mL of gastric juice were

227 added and the resulting mixture was shaken for 1 min before incubating at 37 °C for 4
228 h. Subsequently, the pH was adjusted to 6.8 with saturated sodium bicarbonate to stop
229 the gastric process. After that, 2.0 mL of intestinal juice were added and energetically
230 shaken for 1 min and left at 37 °C for 4 h, with periodical stirring. Then, samples were
231 centrifuged at 6000 rpm for 30 min at 4 °C. The supernatant was filtered through a 0.22
232 µm Nylon filter and was kept at 4 °C until analysis. Blanks of gastrointestinal digestion
233 were prepared in parallel.

234

235 *Se homogeneity in the bread rolls*

236 The homogeneous distribution of Se in 20 bred rolls of approximately 5.0 g each
237 (obtained from a sourdough of 100.0 g of wheat, 2.0 g of NaCl, 50.0 mL of distilled
238 water, and 3.0 g of selenized fresh yeast) was assessed by simulating an industrial
239 baking process. The ingredients were mixed both by hand kneading and mechanical
240 mixing in a V-shaped laboratory mixer to compare the homogeneity of each process.
241 Total Se was determined in every bread roll (3 replicates for each roll).

242

243 **Results and Discussion**

244 *Quality assurance*

245 Detection (LOD) and quantification limits (LOQ) were determined by analyzing, in
246 triplicate, ten solutions of the lowest point of calibration. They were calculated from 3σ
247 and 10σ , respectively, of the signal and then referred to the regression line.
248 Reproducibility was calculated as % RSD (relative standard deviation) from five
249 measurements of two independent standard solutions of 20 and 100 µg L⁻¹ of Se(IV),

carried on three non-consecutive days. A LOD and LOQ of $0.001 \mu\text{g L}^{-1}$ and $0.004 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively, were achieved for total selenium for ICP-MS. For SeMet, LOD was $0.7 \mu\text{g L}^{-1}$ and LOQ was $2.2 \mu\text{g L}^{-1}$. Precision was determined in terms of repeatability and reproducibility, which were better than 2% RSD for ICP-MS.

Quality assurance included the analysis of Se-enriched yeast reference material (SELM-1) certified for SeMet ($3448 \pm 146 \text{ mg Kg}^{-1}$) content. Since the concentration obtained ($3215 \pm 122 \text{ mg Kg}^{-1}$) was in concordance with the certified value, the method used was considered accurate for selenium determination.

Selenium accumulation and biotransformation during the baking process

Baking process needs to be optimized to obtain Se supplemented bread with suitable organoleptic properties for human consumption. Thus, ingredients were mixed at different ratios and they were kneaded until get elastic dough. In addition different times and temperatures of fermentation were tested until rising of the dough leads to twice its size. Baking times and temperatures were optimized in order to achieve a browned crust and spongy crumb, avoiding overbaking. All parameters were optimized until properties such as color, smell, texture and flavor were suitable for human consumption. As a result, 20 min of dough fermentation at 30°C , followed by baking at 200°C for 25 min were selected as optimal conditions for baking.

Samples of flour (wheat flour or wholemeal flour), yeast (fresh and lyophilized) and bread were digested and analyzed to determine total Se content. The results are shown in **Table 1**. Se content in control white and wholemeal bread was $0.28 \pm 0.03 \mu\text{g g}^{-1}$ and $0.10 \pm 0.01 \mu\text{g g}^{-1}$, respectively. Se content in the yeast used for baking was negligible which means that the Se found in the control samples comes from the soil where the

wheat used to produce the flour has been grown.^{6,7} Since the amount of Se determined in control samples before and after baking was similar, it could be said, as other authors did,^{13,35} that there is no Se losses due to the high temperature used for baking. Results in **Table 1** show that Se concentration is three times higher in the white bread control in comparison to the wholemeal bread control. Agronomic biofortification of crops by using Se-rich fertilizers has shown lower Se content in white flour in comparison to wholemeal flour since Se is likely to be highest in embryo³⁶ and it is partially lost during milling process. However, the origin of the flours (wholemeal and white) used in this work is unknown and therefore, differences in Se levels between white and wholemeal control breads cannot be attributed to a single factor. Wholemeal and white bread enriched with $1\mu\text{g Se g}^{-1}$ as Se-yeast contained 1.16 ± 0.02 and $1.28 \pm 0.02 \mu\text{g g}^{-1}$ of Se, respectively. Considering the concentration of Se present in the control bread, the recovery of the added Se was over 99%. Similar results were obtained when selenium was directly added as selenite. Thus, it can be assumed that selenium was incorporated into the bread regardless the method of supplementing selenium (either by adding selenite directly to the dough or by using a Se-enriched yeast for rising the dough).

Determination and quantification of Se species in the proteolytic extracts was performed by HPLC coupled to post-column IDA-ICP-MS. The extraction of Se species in food samples is usually carried out by enzymatic hydrolysis using protease XIV.^{8,9,31,37} Conventionally, enzymatic hydrolysis required incubation times of 17-24 hours^{8,31,37,38}. In the last years, the use of ultrasound and microwave energy^{11,31,39} as alternative methods to speed up the disruption of the membranes have been used.

In the present work, Se-species extraction in Se-enriched bread was carried out with and without enzymes. The extraction of species without enzymes resulted in low recovery values, only a $17 \pm 1\%$ of the total Se was extracted while quantitative extraction (101

± 2 %) was achieved by using enzymatic hydrolysis with protease in Tris-HCl. In order to speed up the sample treatment process, ultrasonic probe sonication (USP) and microwave assisted extraction (MAE) were used. Regarding the amount of Se extracted, no significant differences were observed between the use of MAE (103 ± 3 %), incubation (102 ± 2 %) or USP (105 ± 3 %). However, the methodology based on the use of ultrasonic probe was chosen for further experiments due to a significant decrease of the extraction time (2 minutes in comparison with 30 minutes and 24 hours for MAE and incubation, respectively). As a result, enzymatic hydrolysis with protease XIV in 30 mM Tris-HCl buffer by USP was chosen for performing Se extraction from both the raw ingredients and the baking products.

Figure 1 shows that SeMet is the main Se species detected in flour and bread samples by LC-ICP-MS, using both anionic exchange and reversed-phase separation columns. Due to the lack of Se-labeled standards, quantification of the Se species was performed using post-column IDA-ICP-MS, by continuous mixing ^{77}Se spike solution with the effluent of the column. SeMet in Se-enriched white and wholemeal bread represents around 80% of total Se present in the sample. On the other hand, the similarity between SeMet values obtained in Se-enriched bread and in the Se-enriched white dough (**Table 1**) indicates that the baking process does not affect the integrity of SeMet. This finding is in line with data reported by Hart *et al.*¹³ Contrarily, Warburton and Goenaga-Infante²² observed a decrease in SeMet content after bread processing and production, although this could be due to differences in the methods used to prepare the bread.

Despite the accurate results obtained using protease, the presence of Se-species in the enzyme⁴⁰ used for extracting seleno compounds may have a negative impact on the detection limit and therefore, a special control of the blanks is required. The use of acid hydrolysis as an alternative to Se-species extraction³³ was tested using incubation bath,

USP and MAE, unfortunately only a 7% of the total SeMet content was extracted. The success of acid hydrolysis in releasing seleno-amino acids is highly dependent on the sample matrix. D'Ulivo⁴¹ reported that SeMet and SeCys standards were broken down and remained stable up to 22 h, whereas the extraction efficiency observed by Montes-Bayón *et al.*⁴² for SeMet in *Brassica juncea* was very low. Acid hydrolysis is a harsh treatment that can lead to degradation of Se-species or to some matrix degradation, which can hinder the determination of the species of interest. Therefore, since acid hydrolysis did not provide a reasonable recovery of SeMet, the optimized enzymatic hydrolysis was chosen for the experiments, paying special attention to the blanks. As a result, blank analysis were always performed because the content of Se can vary between protease batches.

The supplementation of Se for the preparation of Se-enriched bread was performed by adding either selenite directly to the dough or using laboratory-made selenized yeast. When selenite was directly added to the dough, Se was quantitatively incorporated to the bread, but SeMet content was similar to that present in the flour (**Table 1**). The low SeMet content could be attributed to an incomplete transformation of selenite into SeMet when dosing directly selenite to the dough. As it was evidenced by size exclusion chromatography-ICPMS (**Figure 2**), Se was biotransformed to other low molecular weight (< 5 kDa) intermediate Se-species, which were not detected through anion exchange or reversed-phase HPLC-ICPMS. The results obtained are in disagreement with those published by other authors. Lazo-Vélez *et al.*⁴³ reported a complete transformation of selenite to selenomethionine when adding directly selenite. The differences could be attributed to the presence of sugar and other ingredients during baking. Therefore, direct addition of Se to the dough was not considered in the present work to prepare Se-enriched bread.

349 Se-enriched bread was successfully obtained by using selenized yeast, which was
350 prepared in the lab following the protocol described in Methods section. Selenized yeast
351 must be obtained under controlled conditions, since yeast proliferates under aerobic and
352 anaerobic conditions and can use different compounds as carbon sources, leading to a
353 wide variety of Se-compounds.⁴⁴ Factors such as a rigorous temperature control,
354 stirring, ventilation, and incubation time are extremely important to ensure that SeMet is
355 the primary species produced. Fermentation process of *Saccharomyces cerevisiae* in
356 YEPD culture media was monitored for over 96 hours (3 different time points, 12, 24,
357 and 96 h). After 96 h of incubation, selenomethionine accounted for approximately 70%
358 of the added Se (**Table 1**). A typical anion exchange-ICPMS chromatogram of Se-
359 enriched yeast at different incubation times is shown in **Figure 3**.

360 During the experiments, it was observed that the use of fresh baker's yeast lead to
361 problems associated with variations in flavor, odor and rate of fermentation, originating
362 bread rolls with bad flavor and gray color. It is well known that one of the most
363 satisfactory methods for preserving yeast is the use of dry yeast. So, in the current work
364 the preparation of Se-enriched yeast was also performed by using dry yeast. Thus,
365 freeze dried yeast, acquired from a local market, was rehydrated and then cultured in
366 presence of 5 μg of selenite (in order to have $1\mu\text{g g}^{-1}$ in the resulting bread) following
367 the procedure already described when using fresh yeast. Analysis of total Se in the
368 resulting selenized -yeast provided concentration values accounted for 103% and 34%
369 of the added Se, for fresh and freeze-dried yeast, respectively (**Table 1**). Although both
370 lyophilized and fresh yeast can incorporate and biotransform Se, the conditions used in
371 this work allow fresh yeast to accumulate higher amounts of Se and therefore of SeMet,
372 in comparison with lyophilized yeast. Therefore selenite was added through Se-fresh
373 yeast to prepare Se-enriched bread.

374 Since Se was added to the dough through the yeast, which is 3% of the total weight of
375 bread, a perfect distribution of this ingredient is crucial for homogeneity. A common
376 baking practice is preparing a sourdough and then divided it into small rolls. In order to
377 facilitate the migration from the lab- scale to the pilot-scale, sourdough elaboration was
378 carried out either by mixing the ingredients by hand or mechanically following the
379 procedure described in Methods section. Once the sourdough was done, it was divided
380 into 20 bread rolls of approximately 5 g each. After baking, the resulting bread rolls
381 underwent microwave assisted acid digestion for Se concentration determination by
382 IDA-ICP-MS. **Figure 4** shows that the distribution of Se in rolls prepared by hand
383 kneading is less homogeneous and had higher standard deviation values in comparison
384 with rolls prepared by mechanical mixing of the ingredients.

385

386 *Bioaccessibility of Se in Se-enriched bread and estimated human intake*

387 Bioaccessibility depends on the chemical form of the elements that finally reach the
388 absorption site to cross the intestinal barrier. The species can be altered during digestion
389 and this can affect their absorption rate. Here, an *in vitro* simulated gastrointestinal
390 digestion of Se-enriched bread (white and wholemeal) was carried out to determine the
391 amount of Se that could be absorbed by the body. Soluble Se fractions after simulated
392 gastric and gastrointestinal digestion in Se-enriched white bread were 75% and 89% of
393 total Se respectively, whereas in Se-enriched wholemeal bread the amount of extracted
394 Se was much lower (*ca.* 40%). The content of bioaccessible Se-species was determined
395 by HPLC-IDA-ICPMS (**Table 2**). SeMet was the main species found in Se-enriched
396 white bread. Se-species in the bioaccessible fraction of Se-wholemeal bread were below
397 the LOD. Differences in Se bioaccessibility between white and wholemeal bread could

398 be due to the presence of dietary fiber, an unavailable carbohydrate¹⁷ present in higher
399 amounts in wholemeal than in white bread. High contents of fiber can lower both
400 protein and starch digestibility,⁴⁵ and, thus, the capability of enzymes to release Se
401 from those compounds. The results described above suggest that most of the Se in Se-
402 enriched white bread is potentially bioaccessible after gastrointestinal digestion whereas
403 Se in the wholemeal bread is not. The results obtained are of interest from the
404 nutritional point because of the relatively high consumption of whole wheat products.
405 Nevertheless, many other factors such as the nutritional status, growth, pregnancy,
406 presence or absence of dietary micronutrient, inhibitors or enhancing substances, the
407 concomitant ingestion of certain drugs, etc.,^{16,46} can affect the final absorption. In a
408 study carried out with human volunteers, Fox *et al.*⁴⁷ observed that over 80% of the Se
409 from wheat was absorbed. Other studies in humans have shown the capacity of Se-
410 enriched wheat and bread to increase selenium and glutathione peroxidase status in
411 plasma.^{48,49}

412 Based on these results, an estimation of Se intake was carried out. A daily consumption
413 of approximately 60 g of Se-enriched white bread, following the Guidelines for Healthy
414 Nutrition,⁵⁰ would provide 70 µg of Se per day (RDA is 55-70 µg day⁻¹). However, the
415 amount of selenium supplied by other food sources should be also taken into
416 consideration.

417 To the best of our knowledge, this is the first time that homogeneous Se-enriched bread
418 is obtained by using selenized fresh yeast, with good recoveries of SeMet. The simple,
419 cheap and fast procedure used could be considered as an alternative to the more
420 expensive and more extended procedure of agronomic biofortification of crops using
421 Se-fertilizers. A scale-up development for Se-enriched bread is also proposed. Almost
422 all (99%) of the added Se by using selenized fresh yeast, was incorporated in

423 the bread with SeMet accounting for 80% of total Se. Se-enriched bread, with
424 SeMet as the main species, can be a suitable source of this element for people with Se
425 deficiency. The bioaccessibility of selenium in Se-enriched bread was $100\pm 3\%$ and
426 $40\pm 1\%$ for white and wholemeal bread, respectively. The results obtained are of interest
427 from the nutritional point because of the relatively high consumption of whole wheat
428 products.

429

430 **Acknowledgments**

431 The Complutense University Group of Trace and Speciation Analysis would like to
432 thank the Spanish Commission of Science and Technology (CTQ2011-22732), the
433 Community of Madrid, (Spain), and the European Community for funding the FEDER
434 program (S2010/AGR-1464, ANALYSIC II). María Sánchez-Martínez would also like
435 to thank the Spanish Government for her doctoral fellowship (CTQ2008-05925).

436

437 **References**

- 438 (1) Jackson, M. I.; Combs, G. F. Jr. Selenium and anticarcinogenesis: underlying
439 mechanisms. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **2008**, 11, 718-726.
- 440 (2) Rayman, M. P. The importance of selenium to human health. *Lancet.* **2000**, 356,
441 233-241.
- 442 (3) Rayman, M. P. The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it
443 measure up? *Brit. J. Nutr.* **2004**, 92, 557-573.
- 444 (4) UK EGVM (United Kingdom Expert Group on Vitamins and Minerals). *Revised*
445 *review of selenium (EVM/99/17.REVISED AUG2002)*. UK EGVM: United Kingdom,
446 2002.
- 447 (5) AESAN (Spanish Agency of Food Security and Nutrition). *Nutritional evaluation of*
448 *Spanish diet II. Micronutrients. National Survey of Dietetic Intake (ENIDE)*. Ministry of
449 Health: Spain, 2001.
- 450 (6) Dumont, E.; Vanhaeck, F.; Cornelis, R. Selenium speciation from food source to
451 metabolites: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 385, 1304-1323.
- 452 (7) Combs, G. F. Selenium in global foods systems. *Brit. J. Nutr.* **2001**, 85, 517-547.
- 453 (8) Pérez-Corona, M. T.; Sánchez-Martínez, M.; Valderrama, M. J.; Rodríguez, M. E.;
454 Cámara, C.; Madrid, Y. Selenium biotransformation by *Saccharomyces cerevisiae* and
455 *Saccharomyces bayanus* during white wine manufacture: Laboratory-scale experiments.
456 *Food Chem.* **2011**, 124, 1050-1055.

- 457 (9) Sánchez-Martínez, M.; Galvao, P. da Silva, E.; Pérez-Corona, T.; Cámara, C.;
458 Ferreira, S. L. C.; Madrid, Y. Selenite biotransformation during brewing. Evaluation by
459 HPLC-ICP-MS. *Talanta*. **2011**, 88, 272-276.
- 460 (10) Alzate, A.; Fernández-Fernández, A.; Pérez-Conde, C.; Gutiérrez, A.M.; Cámara,
461 C. Comparison of biotransformation of inorganic selenium by *Lactobacillus* and
462 *Saccharomyces* in lactic fermentation process of yogurt and kefir. *J. Agr. Food Chem.*
463 **2008**, 56, 8728-8736.
- 464 (11) Peñas, E.; Martínez-Villaluenga, C.; Frías, J.; Sánchez-Martínez, M. J.; Pérez-
465 Corona, M. T.; Madrid, Y.; Cámara, C.; Vidal-Valverde, C. Se improves indole
466 glucosinolate hydrolysis products content, Se-methylselenocysteine content, antioxidant
467 capacity and potential anti-inflammatory properties of sauerkraut. *Food Chem.* **2012**,
468 132, 907-914.
- 469 (12) Galinha, C.; Freitas, M. C.; Pacheco, A. M. G.; Coutinho, J.; Maças, B.; Almeida,
470 A. S. Determination of selenium in bread-wheat samples grown under a Se-
471 supplementation regime in actual field conditions. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2012**, 291,
472 231-235.
- 473 (13) Hart, D. J.; Fairweather-Tait, S. J.; Broadley, M. R.; Dickinson, S. J.; Foot, I.;
474 Knott, P.; McGrath, S. P.; Mowat, H.; Norman, K.; Scott, P. R.; Stroud, J. L.; Tucker,
475 M.; White, P. J.; Zhao, F. J.; Hurst, R. Selenium concentration and speciation in
476 biofortified flour and bread: Retention of selenium during grain biofortification,
477 processing and production of Se-enriched food. *Food Chem.* **2011**, 126, 1771-1778.
- 478 (14) Kirby, J. K.; Lyons, G. H.; Karkkainen, M. P. Selenium speciation and
479 bioavailability in biofortified products using species-unspecific isotope dilution and

- 480 reversed phase ion pairing-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J. Agr. Food*
481 *Chem.* **2008**, 56, 1772-1779.
- 482 (15) Bryszewska, M. A.; Ambroziak, W.; Diowks, A.; Baxter, M. J.; Langford, N. J.;
483 Lewis, D. J. Changes in the chemical form of selenium observed during the
484 manufacture of a selenium-enriched sourdough bread for use in a human nutrition study.
485 *Food Addit. Contam.* **2005**, 22, 135-140.
- 486 (16) Welch, R. M.; Graham, R. D. Agriculture: the real nexus for enhancing
487 bioavailable micronutrients in food crops. *J. Trace Elem. Med. Bio.* **2005**, 18, 299-307.
- 488 (17) Dewettinck, K.; Van Bockstaele, F.; Kühne, B.; Van de Walle, D.; Courtens, T. M.;
489 Gellynck, X. Nutritional value of bread: Influence of processing, food interaction and
490 consumer perception. *J. Cereal Sci.* **2008**, 48, 243-257.
- 491 (18) Zhao, F.; López-Bellido, F. J.; Gray, C. W.; Whalley, W. R.; Clark, L. J.;
492 McGrath, S. P. Effects of soil compaction and irrigation on the concentrations of
493 selenium and arsenic in wheat grains. *Sci. Total Environ.* **2007**, 372, 433-439.
- 494 (19) Siega-Riz, A. M.; Popkin, B. M.; Carson, T. Differences in food patterns at
495 breakfast by sociodemographic characteristics among a nationally representative sample
496 of adults in the United States. *Prev. Med.* **2000**, 30, 415-424.
- 497 (20) González-Turmo, I. The Mediterranean diet: Consumption, cuisine and food habits.
498 In *Mediterra. The Mediterranean diet for sustainable regional development*;;
499 Mombiela, F., Eds.; Presses de Sciences Po: Paris, 2012; pp. 115-132.
- 500 (21) Barret, J.; Patterson, C.; Reilly, C.; Tinggi, U. Selenium in the diet of children with
501 phenylketonuria. In *Nutrient Availability: Chemical and Biological Aspects*; Southgate,

- 502 D. A. T.; Johnson, I. T.; Fenwick, G. F., Eds.; Royal Society of Chemistry: London,
503 UK, 1989; pp. 281-283.
- 504 (22) Warburton, E.; Goenaga-Infante, H. Methane mixed plasma-improved sensitivity
505 of inductively coupled plasma mass spectrometry detection for selenium speciation
506 analysis wheat-based food. *J. Anal. Atom. Spectrom.* **2007**, 22, 370-376.
- 507 (23) Cubadda, F.; Aureli, F.; Ciardullo, S.; D'Amato, M.; Raggi, A.; Acharya, R.;
508 Reddy, R. A. V.; Prakash, N. T. Changes in selenium speciation associated with
509 increasing tissue concentrations of selenium in wheat grain. *J. Agr. Food Chem.* **2010**,
510 58, 2295-2301.
- 511 (24) Gerrior, S.; Bente, L.; Hiza, H. *Nutrient content of the US food supply, 1909-2000*.
512 Department of Agriculture, Center for Nutrition Policy and Promotion: US, 2004.
- 513 (25) MacPherson, A.; Barclay, M. N. I.; Scott, R.; Yates, R. W. S. Loss of Canadian
514 wheat imports lowers selenium intake and status of Scottish population. In *Trace*
515 *Elements in Man and Animals*; Fischer, P. W. F.; L'Abbé, M. R.; Cockell, K. A.;
516 Gibson, R. S., Eds.; NCR Press: Ottawa, Canada, 1997; pp. 203-205.
- 517 (26) García-Alonso, J. I.; Rodríguez, P. La dilución isotópica en el análisis de trazas. In
518 *Análisis químico de trazas*; Cámara, C.; Pérez-Conde, C., Eds.; Editorial Síntesis S.A.:
519 Spain, 2001; pp. 223-278.
- 520 (27) Rosell, C. M.; Santos, E.; Sanz-Penella, J. M.; & Haros, M. Wholemeal wheat
521 bread: A comparison of different breadmaking processes and fungal phytase addition. *J.*
522 *Cereal Sci.* **2009**, 50, 272-277.

- 523 (28) Martínez-Sierra, J. G.; Moreno-Sanz, F.; Herrero-Espílez, P.; Marchante-Gayón, J.
524 M.; García-Alonso, J. I. Biosynthesis of sulfur-34 labelled yeast and its characterisation
525 by multicollector-ICP-MS. *J. Anal. Atom. Spectrom.* **2007**, 22, 1105-1112.
- 526 (29) Ponce de León, C. A.; Bayón, M. M.; Paquin, C., Caruso, J. A. Selenium
527 incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation
528 methods. *J. Appl. Microbiol.* **2002**, 92, 602-610.
- 529 (30) Cabañero, A. I.; Madrid, Y.; Cámara, C. Selenium and mercury bioaccessibility in
530 fish samples: an in vitro digestion method. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 526, 51-61.
- 531 (31) Pedrero, Z.; Ruiz-Encinar, J.; Madrid, Y.; Cámara, C. Application of species-
532 specific isotope dilution analysis to the correction for selenomethionine oxidation in Se-
533 enriched yeast simple extracts during storage. *J. Anal. Atom. Spectrom.* **2007**, 22, 1061-
534 1066.
- 535 (32) Hinojosa-Reyes, L.; Marchante-Gayón, J. M.; García-Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A.
536 Determination of selenium in biological materials by isotope dilution analysis with an
537 octapole reaction system ICP-MS. *J. Anal. Atom. Spectrom.* **2003**, 18, 11-16.
- 538 (33) Aitken, A.; Learmonth, M. Quantitation of Tryptophan in Proteins. In *The Protein*
539 *Protocols Handbook*, 2nd Edition; Walker, J. M., Eds.; Humana Press: New Jersey,
540 USA, 2002: pp. 41-44.
- 541 (34) Luten, J.; Crews, H.; Flynn, A.; Van-Dael, P.; Kastenmayer, P.; Hurrell, R.;
542 Deelstra, H.; Shen, L.; Fairweather-Tait, S.; Hickson, K.; Farré, R.; Schlemmer, U.;
543 Frohlich, W. Interlaboratory trial on the determination of the *in vitro* iron dialysability
544 from food. *J. Sci. Food Agr.* **1996**, 72, 415-424.

- 545 (35) Garvin, D. F.; Hareland, G.; Gregoire, B. R.; Finley, J. W. Impact of wheat grain
546 selenium content variation on milling and bread baking. *Cereal Chem.* **2011**, 88, 195-
547 200.
- 548 (36) Moore, K. L.; Shröder, M.; Lombi, E.; Zhao, F.; McGrath, S. P.; Hawkesford, M.
549 J.; Shewry, P. R.; Grovenor, R. M. NanoSIMS analysis of arsenic and selenium in
550 cereal grain. *New Phytol.* **2010**, 185, 434-445.
- 551 (37) Goenaga-Infante, H.; Sturgeon, R.; Turner, J.; Hearn, R.; Sargent, M.; Maxwell, P.;
552 Yang, L.; Barzev, A.; Pedrero, Z.; Cámara, C.; Díaz-Huerta, V.; Fernández-Sánchez, M.
553 L.; Sanz-Medel, A.; Emese, K.; Fodor, P.; Wolf, W.; Goldschmidt, R.; Vacchina, V.;
554 Szpunar, J.; Valiente, L.; Huertas, R.; Labarraque, G.; Davis, C.; Zeisler, R.; Turk, G.,
555 Rizzio, E., Mackay, L. G., Myers, R. B., Saxby, D. L.; Askew, S.; Chao, W.; Jun, W.
556 Total selenium and selenomethionine in pharmaceutical yeast tablets: assessment of the
557 state of the art of measurement capabilities through international intercomparison
558 CCQM-P86. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 390, 629-642.
- 559 (38) Cabañero, A. I.; Madrid, Y.; Cámara, C. Enzymatic probe sonication extraction of
560 Se in animal-based food samples: a new perspective on sample preparation for total and
561 Se speciation analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 381, 373-379.
- 562 (39) Peachey, E.; McCarthy, N.; Goenaga-Infante, H. Acceleration of enzymatic
563 hydrolysis of protein-bound selenium by focused microwave energy. *J. Anal. Atom.*
564 *Spectrom.* **2008**, 23, 487-492.
- 565 (40) Cuderman, P.; Sitbilj, V. How critical is the use of commercially available
566 enzymes for selenium speciation? *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 393, 1007-1013.

- 567 (41) D'Ulivo, A. Determination of selenium and tellurium in environmental samples.
568 Critical Review. *Analyst*. **1997**, 122, 117R-144R.
- 569 (42) Montes-Bayón, M.; Yanes, E. G.; Ponce de León, C.; Jayasimhulu, K.; Stalcup,
570 A.; Shann, J.; Caruso, A. Initial studies of selenium speciation in *Brassica juncea* by LC
571 with ICPMS and ES-MS detection: an approach for phytoremediation studies. *Anal.*
572 *Chem.* **2002**, 74, 107-113.
- 573 (43) Lazo-Vélez M. A.; Gutiérrez-Díaz V. A.; Ramírez-Medrano A. Effect of sodium
574 selenite addition and sponge dough fermentation on selenomethionine generation during
575 production of yeast-leavened breads. *J. Cereal Sci.* **2013**, 58, 164-169.
- 576 (44) Rampler, E.; Rose, S.; Wieder, D.; Ganner, A.; Dohnal, I.; Dalik, T.; Hann S.;
577 Koellensperger, G. Monitoring the production process of selenized yeast by elemental
578 speciation analysis. *Metallomics*. **2012**, 4, 1176-1184.
- 579 (45) FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization).
580 *Protein quality evaluation report of a joint FAO/WHO expert consultation*; Food and
581 Agriculture Organization: Rome, Italy, 1991.
- 582 (46) Pedrero, Z.; Madrid, Y.; Cámara, C. Selenium species bioaccessibility in enriched
583 radish (*Raphanus sativus*): A potential dietary source of selenium. *J. Agr. Food Chem.*
584 **2006**, 54, 2412-2417.
- 585 (47) Fox, T. E.; Atherton, C.; Dainty, J. R.; Lewis, D. J.; Langford, N. J.; Baxter, M. J.;
586 Crews, H. M.; Fairweather-Tail, S. J. Absorption of selenium from wheat, garlic, and
587 cod intrinsically labeled with Se-77 and Se-82 stable isotopes. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*
588 **2005**, 75, 179-186.

589 (48) Bryszewska, M. A.; Ambroziak, W.; Langford, N. J.; Baxter, M. J.; Colyer, A.;
590 Lewis, D. J. The effect of consumption of selenium enriched rye/wheat sourdough bread
591 on the body's selenium status. *Plant Food Hum. Nutr.* **2007**, 62, 121-126.

592 (49) Meltzer, H. M.; Norheim, G.; Loken, E. B.; Holm, H. Supplementation with wheat
593 selenium induces a dose-dependent response in serum and urine of a Se-replete
594 population. *Brit. J. Nutr.* **1992**, 67, 287-294.

595 (50) SENC (Spanish Society of Communitary Nutrition). *Guidelines for Healthy*
596 *Nutrition*. Spanish Society of Communitary Nutrition: Madrid, Spain, 2007.

597

598 **Figure Captions**

599 **Figure 1** Typical chromatograms of Se-enriched bread prepared using Se-yeast after
600 enzymatic hydrolysis achieved at m/z 78 by A) anionic exchange PRP-X100 column
601 and B) reversed-phase C8 Zorbax column, coupled to ICP-MS.

602 **Figure 2** Size exclusion chromatograms achieved at m/z 78 by using BioBacic-Sep 60
603 column after enzymatic hydrolysis of control and Se-enriched bread obtained by direct
604 addition of Se in the dough before kneading.

605 **Figure 3** HPLC-ICP-MS chromatogram achieved at m/z 78 by anionic exchange
606 column of Se-enriched yeast produced under controlled conditions of temperature
607 (28°C), stirring (280 rpm), and different times of incubation (16, 72, and 96 h).

608 **Figure 4** Selenium distribution in Se-enriched bread prepared with Se-yeast and
609 combining the ingredients by hand kneading *versus* mechanical mixing.

Table 1. Total Se and SeMet content in raw ingredients and baked products.

	Total Se ($\mu\text{g Se/g d.m.}$)	Extracted Se ($\mu\text{g Se/g d.m.}$)	% Recovery	SeMet ($\mu\text{g Se/g d.m.}$)	% Recovery
Control white wheat flour	0.28 ± 0.01	0.26 ± 0.02	93 ± 1	0.22 ± 0.01	84 ± 3
Control white dough	0.28 ± 0.02	0.28 ± 0.02	100 ± 2	0.23 ± 0.02	83 ± 3
Control white bread	0.28 ± 0.03	0.28 ± 0.02	102 ± 2	0.22 ± 0.01	80 ± 4
Control whole meal flour	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	100 ± 2	< LOD	< LOD
Control wholemeal bread	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	100 ± 2	< LOD	< LOD
Se-enriched fresh yeast	33.96 ± 0.02	34.98 ± 0.05	103 ± 5	24.11 ± 0.05	71 ± 2
Se-enriched dried yeast	27.99 ± 0.03	9.52 ± 0.05	34 ± 4	6.47 ± 0.03	68 ± 1
*Se-enriched white dough	1.29 ± 0.03	1.29 ± 0.06	100 ± 5	0.95 ± 0.03	74 ± 3
*Se-enriched white bread	1.28 ± 0.02	1.29 ± 0.02	101 ± 2	1.04 ± 0.02	81 ± 3
*Se-enriched wholemeal bread	1.16 ± 0.02	1.10 ± 0.02	95 ± 2	0.86 ± 0.05	78 ± 4

Mean \pm SE. N=3 replicates.

*Samples were prepared by dosing selenium as selenized fresh yeast

Table 2. Total selenium and SeMet concentrations in gastric and gastrointestinal simulated extracts.

	Gastric digestion		Gastrointestinal digestion	
	Se ($\mu\text{g/g d.m.}$)	SeMet ($\mu\text{g/g d.m.}$)	Se ($\mu\text{g/g d.m.}$)	SeMet ($\mu\text{g/g d.m.}$)
Control white bread	0.21 ± 0.02	< LOD	0.25 ± 0.01	< LOD
*Se-enriched white bread	0.89 ± 0.01	0.85 ± 0.03	1.25 ± 0.02	1.21 ± 0.02
Control wholemeal bread	0.04 ± 0.01	< LOD	0.04 ± 0.01	< LOD
*Se-enriched wholemeal bread	0.44 ± 0.01	< LOD	0.42 ± 0.01	< LOD

Mean \pm SE N=3 replicates.

* Samples were prepared by dosing selenium as selenized fresh yeast

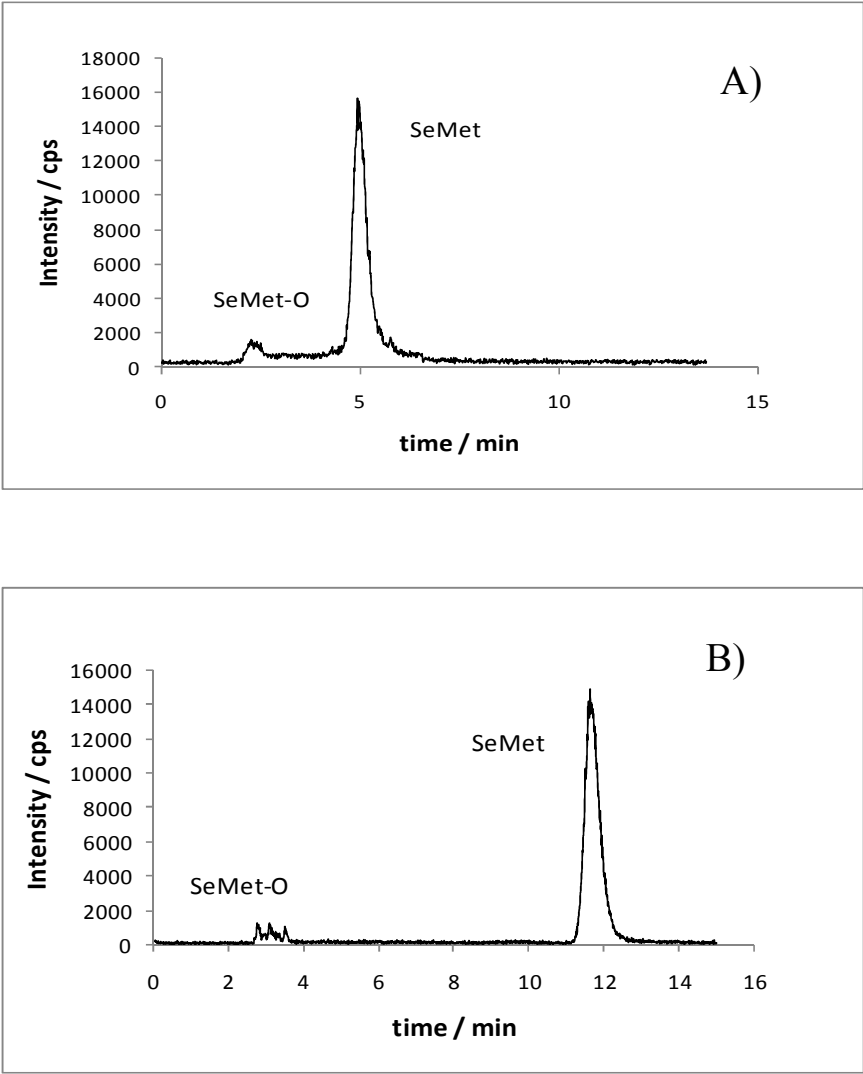
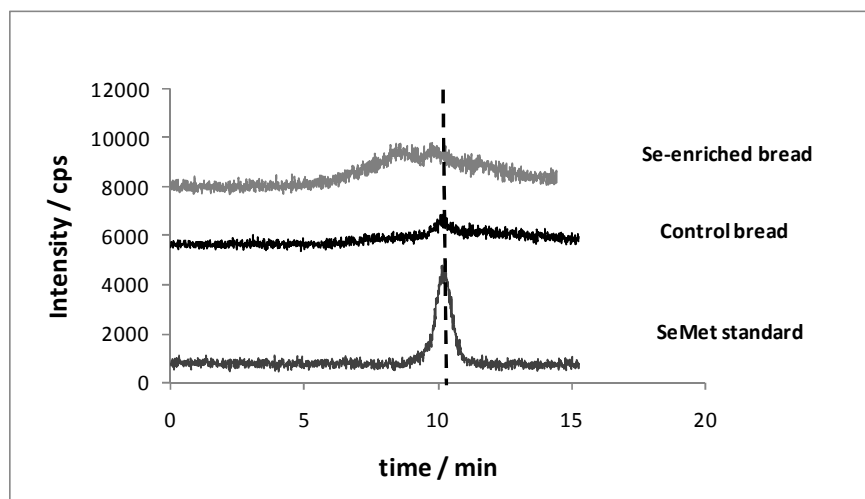


Figure 1

**Figure 2**

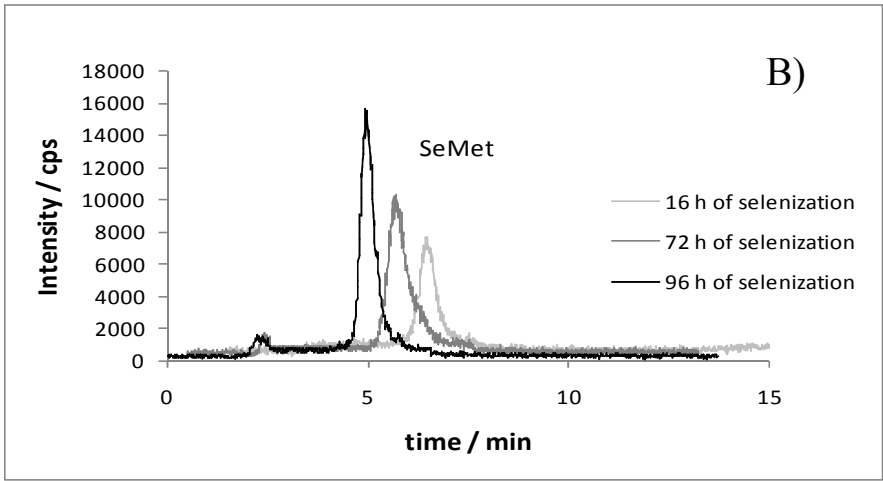


Figure 3

1

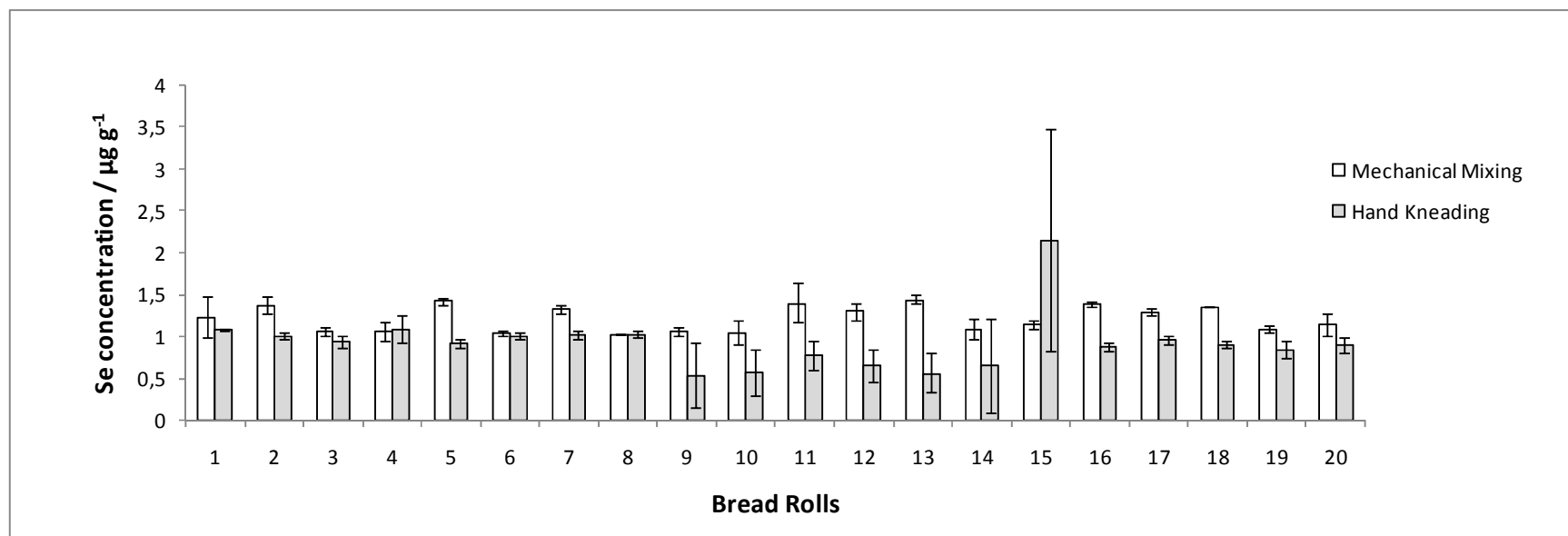


Figure 4

V. CAPÍTULO 2. EVALUACIÓN DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DE SELENIO EN ALIMENTOS FERMENTADOS MEDIANTE LA BACTERIA *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

Además de la levadura, existen otros microorganismos que tienen la capacidad para biotransformar el selenio inorgánico en compuestos orgánicos, como es el caso de las bacterias. Dentro de ellas, la bacteria *Lactobacillus* ha sido utilizada en varios estudios para obtener alimentos enriquecidos en selenio a través de la fermentación ácido-láctica, ya que se ha demostrado que este microorganismo puede transformar el selenito a SeMeSeCys o SeCys₂.

El trabajo presentado en la sección V.2.1. (**“Se improves indole glucosinolate hydrolysis products content, Se-Methylselenocysteine content, antioxidant capacity and potential anti-inflammatory properties of sauerkraut”**, *Food Chemistry* (2012), 132: 907-914) es el resultado de una estrecha colaboración con el Departamento de Microbiología del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). En este trabajo se evaluó el efecto de la adición de selenio, en forma de selenito, en las propiedades del chucrut, un alimento que se obtiene por fermentación de col blanca mediante la acción de la bacteria *Lactobacillus plantarum*, presente de manera natural en la col. El chucrut es un alimento de gran consumo en Europa del Este, y que presenta propiedades antioxidantes y anticancerígenas *per se*, debido a la presencia de ciertos compuestos como la vitamina C o derivados de glucosinolatos. Es por ello que se consideró que el enriquecimiento de dicho alimento con selenio podría dar lugar a un producto de características interesantes para el consumo humano, además de contribuir a suplir las carencias nutricionales de selenio.

De esta forma, se estudió la incorporación y biotransformación del selenio mediante la extracción de especies (con y sin hidrólisis enzimática) y posterior análisis por HPLC-ICP-MS. Esto permitió identificar la SeMeSeCys como especie predominante en el chucrut enriquecido

en selenio, estando dicha especie no unida a proteínas en su mayor parte. Los análisis realizados por el Departamento de Microbiología pusieron de manifiesto que la presencia de selenio aumentaba el contenido del indol-3-carbinol, uno de los productos derivados de glucosinolatos, y a los que se les atribuyen propiedades anticancerígenas y antioxidantes, con lo cual se comprobó que la incorporación del selenio incrementaba la capacidad antioxidante y antiinflamatoria del chucrut.

En este trabajo también se observó que, a pesar de que inicialmente la población microbiana dominante en la col eran las bacterias aeróbicas mesófilas, al comenzar la fermentación la bacteria *Lactobacillus plantarum* crecía en mayor magnitud que el resto de bacterias, convirtiéndose en la especie dominante y responsable de la fermentación y, por tanto, de la biotransformación del selenio. La adición de selenio favoreció aún más el crecimiento de esta bacteria. Estos resultados promovieron la realización de otros estudios posteriores, de nuevo en colaboración con el ICTAN, que se encuentran pendientes de publicar. En esta ocasión se evaluó la influencia de la variación de la flora presente en la col en la biotransformación del selenio, así como el efecto de la adición de diferentes cantidades de selenito. Para ello, se elaboró chucrut adicionando una concentración adicional de 10^6 células/g col de la bacteria aeróbica *Leuconostoc mesenteroides* antes de la fermentación, sin embargo, no se observaron diferencias en la incorporación o biotransformación del selenio en comparación con las coles fermentadas de manera natural por acción de *Lactobacillus plantarum*. La adición de cantidades de entre 2 y 8 $\mu\text{g Se/g col}$ seca no produjo ningún efecto, obteniéndose una incorporación cuantitativa del selenio en todos los casos, tanto en las coles fermentadas de manera natural como a las que se les había adicionado *L. mesenteroides*.

Paralelamente se llevó a cabo la optimización de la extracción de especies de selenio en el chucrut, para lo cual se evaluó la influencia del medio extractante en el proceso de extracción. Para ello, se realizó la extracción asistida por USP, con y sin proteasa, empleando una disolución reguladora Tris-HCl a pH 7.5, en lugar de agua destilada. Finalmente se identificaron

las especies utilizando distintos mecanismos de separación cromatográficos: intercambio aniónico, PRP-X100, y fase inversa C8, RP-C8 Zorbax (Figura 11). El uso de la solución reguladora permitió extraer cerca de un 80% de SeMeSeCys, independientemente de si se utilizaba o no proteasa.

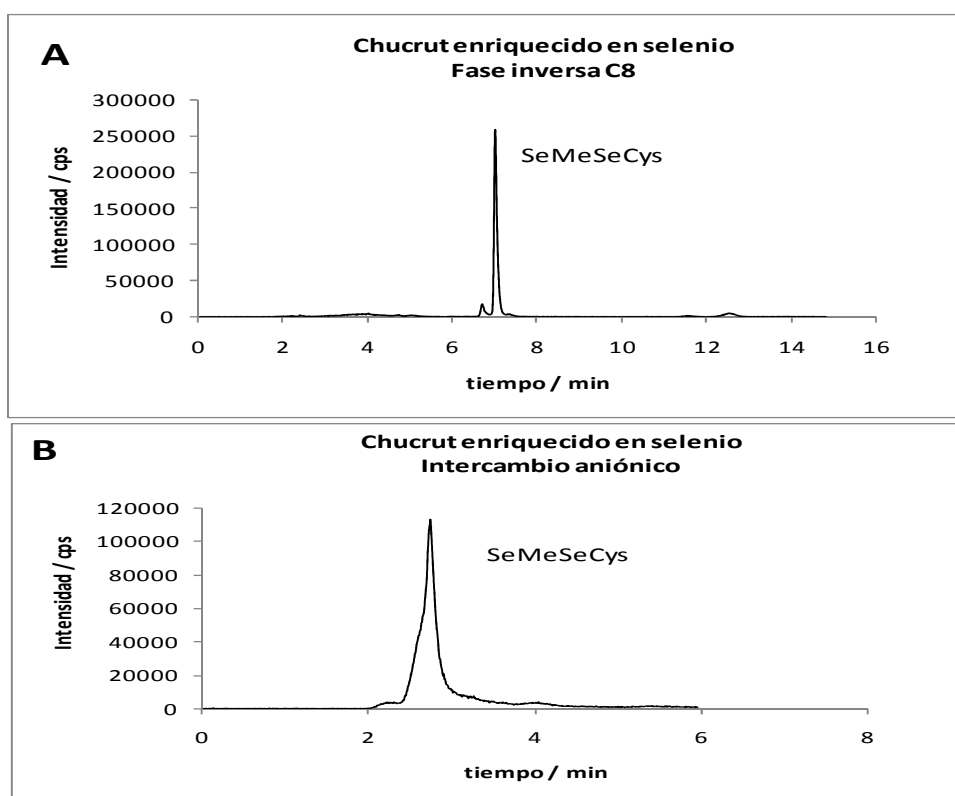


Figura 11. Chucrut enriquecido en selenio, obtenido por fermentación natural con *Lactobacillus plantarum*. Cromatogramas obtenidos empleando columna de A) fase inversa C8 y B) intercambio aniónico.

Estos estudios ponen de manifiesto que el chucrut, que es un alimento saludable, puede complementar sus propiedades beneficiosas con la presencia de selenometilselenocisteína.

V.2.1. EL SELENIO AUMENTA EL CONTENIDO DE LOS INDOLES PRODUCIDOS POR HIDRÓLISIS DE GLUCOSINOLATOS, LA CONCENTRACIÓN DE SELENOMETILSELENOCISTEÍNA, LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIA DEL CHUCRUT.

“Se improves indole glucosinolate hydrolysis products content, Se-Methylselenocysteine content, antioxidant capacity and potential anti-inflammatory properties of sauerkraut”, *Food Chemistry* (2012), 132: 907-914.

Este trabajo fue presentado en:

“Euro Food Chem XVI. Translating Food Chemistry into Health Benefits”, Gdansk, Polonia. Julio, 2011.

“7th International Franco-Spanish Workshop on Bio-Inorganic Analytical Chemistry”, Gijón, España. Julio, 2012.



Se improves indole glucosinolate hydrolysis products content, Se-methylselenocysteine content, antioxidant capacity and potential anti-inflammatory properties of sauerkraut

Elena Peñas^a, Cristina Martinez-Villaluenga^a, Juana Frias^a, Maria José Sánchez-Martínez^b, Maria Teresa Pérez-Corona^b, Yolanda Madrid^b, Carmen Cámara^b, Concepción Vidal-Valverde^{a,*}

^a Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

^b Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 May 2011

Received in revised form 19 October 2011

Accepted 14 November 2011

Available online 20 November 2011

Keywords:

Fermented cabbage

Selenium

Glucosinolate breakdown products

Antioxidant activity

Anti-inflammatory activity

ABSTRACT

Selenium (Se) has a well-known role in prevention of chronic diseases associated with oxidative stress and inflammation. The objective was to produce Se-enriched sauerkraut and to study the effect of selenite addition on indole glucosinolate hydrolysis products, vitamin C, Se biotransformation and microbial quality. The antioxidant activity of sauerkraut and its ability to inhibit NO production in LPS-induced macrophages were also examined. White cabbage was naturally fermented with 0.3 mg of Na₂SeO₃/kg fresh cabbage (NFSe) or without Se addition (NF). Total Se content reached up to 1.29 µg/g d.m. (0.11 µg/g f.m.). Selenomethylselenocysteine was the major Se form found in NFSe cabbage. Se addition caused a slight reduction of ascorbigen (6%) and vitamin C (5%) contents in sauerkraut ($P \leq 0.05$); however, lactic acid bacteria increased (3%), and the formations of indole-3-carbinol and indole-3-acetonitrile were markedly enhanced (74% and 13%, respectively). NFSe cabbage extracts showed higher ($P \leq 0.05$) antioxidant activity (163 µmol trolox/g d.m.) and inhibition of NO production in LPS-induced macrophages ($IC_{50} = 44.0 \mu\text{g/ml}$) than did NF cabbage extracts. Consequently, Se-enriched sauerkraut can be considered as a health-promoting food.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Selenium (Se), as a component of selenoamino acids and selenoproteins, is essential in important physiological functions, such as redox homeostasis (Behne, Alber, & Kyriakopoulos, 2010), thyroid hormone metabolism and stimulation of the immune system, to increase antibody production (Hartikainen, 2005). Recently, Se has attracted great interest, through intensive investigations showing the potential of Se to protect against oxidative stress and chronic inflammation, conditions commonly associated with several chronic diseases (Navarro-Alarcon & Cabrera-Vique, 2008). Indeed, several human studies have suggested that optimal Se status could prevent cancer, cardiovascular disease and type 2 diabetes (Reid et al., 2008; Stranges, Nava-Acien, Rayman, & Guallar, 2010).

Recommended Se dietary intake is not well-standardised among different countries. The recommended dietary allowance (RDA) for Se in the USA is 55 µg/day for men and women (NRC, 2000) while the WHO recommends a Se intake of 40 and 30 µg/day for men and women, respectively, (WHO/FAO/IAEA, 1996). Se intake,

especially in southern and eastern European countries, is below the RDA (Rayman, 2008) and consumption of Se supplements has been the most widespread approach to prevent Se deficiency. Consumption of Se-enriched foods has been increasing markedly in recent years in an attempt to increase Se status and promote health of Se-deficient populations (Hu, McIntosh, Le Leu, & Young, 2010). Several authors have reported preparation of Se-enriched foods by means of fermentation processes (Alzate, Fernández-Fernández, Pérez-Conde, Gutiérrez, & Cámara, 2008). Yeasts and lactic acid bacteria have shown ability to accumulate and transform inorganic Se to organoSe compounds (Alzate et al., 2008; Ponce de León, Bayón, Paquín, & Caruso, 2002). For instance, selenomethionine was found to be the main Se-species in selenised white wine produced by *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* (Pérez-Corona et al., 2011). Therefore, Se-enriched fermented foods could become a dietary source of bioavailable and physiologically relevant Se forms.

Sauerkraut, a popular product resulting from the lactic acid fermentation of white cabbage, is a valuable vegetable plant-food, due to its nutritional and health-promoting properties, mainly attributed to its high content of antioxidant compounds, such as vitamin C and phenolic compounds (Harmaum, Hubbermann, Zhu,

* Corresponding author. Tel.: +34 915622900x241; fax: +34 915644873.

E-mail address: cvidal@ifi.csic.es (C. Vidal-Valverde).

& Schwarz, 2008; Peñas, Frias, Sidro, & Vidal-Valverde, 2010), which prevent cell damage caused by free radicals. Besides that, sauerkraut presents high levels of glucosinolate (GLS) breakdown products (Ciska & Pathak, 2004), such as isothiocyanates (ITC), indole-3-carbinol (I3C), indole-3-acetonitrile (I3ACN) and ascorbigen (ABG), which is the most abundant (Ciska & Pathak, 2004; Martinez-Villaluenga et al., 2009; Peñas et al., 2010). GLS-breakdown products have been linked to reduction of cancer risk by inhibiting phase I enzymes, involved in carcinogen activation and inducing phase II enzymes, involved in the detoxification of xenobiotics (Das, Tuagi, & Haur, 2000; Mithen, 2001). These compounds also inhibit tumour cell growth and stimulate apoptosis (Johnson, 2002). Several studies have also demonstrated that ITC modulate different pathways of cancer-related inflammation (Pan, Lai, Dushenkov, & Ho, 2009).

There is no literature information on the effect of Se addition during cabbage fermentation on the bioactive compounds and biological properties of sauerkraut. Therefore, the objective of this study was to produce Se-enriched sauerkraut and to study the effect of selenite addition on indole glucosinolate hydrolysis products, vitamin C, Se biotransformation and microbial quality. The antioxidant activity of sauerkraut and its ability to inhibit NO production in LPS-induced macrophages were also examined.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and cell lines

Protease XIV, selenomethionine (SeMet), selenomethylselenocysteine (SeMeSeCys) and selenocystine (SeCys₂), sodium selenite (Na₂SeO₃), sodium selenate (Na₂SeO₄), dimethylsulphoxide (DMSO) and penicillin/streptomycin were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Murine macrophages (RAW 264.7), Dubelccós modified Eagle Medium (DMEM) and fetal bovine serum were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). The CellTiter 96 Aqueous One Solution Proliferation assay kit was provided by Promega Biotech Iberica (Madrid, Spain).

2.2. Plant material

White cabbages (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* cv. Megaton), grown in the north region of Spain (La Rioja), during winter season, 2008, were selected among five Spanish cultivars, based on their glucobrassicin content (Peñas, Frias, Martinez-Villaluenga, & Vidal-Valverde, 2011). Fresh cabbages were provided by Bejo Iberica S. L. (Madrid, Spain) and fermented immediately upon reception.

2.3. Preparation of Se-enriched sauerkraut

Cabbage heads were prepared by removing the outer leaves and their central core. The edible part of cabbages was then shredded into about 2 mm thick strips using a shredder (Moka Express, Barcelona, Spain). Subsequently, 0.5% NaCl and 0.3 mg of sodium selenite/kg of fresh cabbage (1.6 mg Se/kg of dry matter) were added to achieve the Se RDA and a high selenite biotransformation in selenoaminoacids. Shredded cabbage and brine were mixed thoroughly, transferred to sterile polyethylene vessels (8 l) and tightly pressed to exclude air. Fermentations were performed spontaneously by the indigenous microbiota present on raw cabbage (NFSe). Sauerkrauts, without addition of Se, were also prepared and considered as controls (NF). Fermentations were carried out in 3 batches (4 kg per batch) at room temperature (22–25 °C) for 7 days. On the third day, cabbage was pricked to remove releasing gases. Raw, NF and NFSe cabbages were

freeze-dried, milled and stored at –20 °C under vacuum prior to their analyses.

2.4. Determination of pH during fermentation

Brines from each fermentation batch (2 ml) were collected at 0, 3 and 7 days of fermentation and their pH values were measured in a pH metre Basic 20 (Crison, Barcelona, Spain).

2.5. Analysis of indole GLS-derived compounds

Extraction of indole GLS-derived compounds was carried out by homogenisation of 0.5 g of freeze-dried material in 50% acetone, using an Ultra Turrax homogeniser T-25 Digital (Ika Werke GMBH & Co. KG, Staufen, Germany), as described in Peñas et al. (2010). The content of ABG, I3C and I3ACN were determined by HPLC-PAD in raw and fermented cabbages (Peñas et al. 2010). Results were expressed as µmol of indole GLS-derived compound per 100 g of dry matter (µmol/100 g d.m.).

2.6. Determination of vitamin C

Vitamin C was determined by extraction with 3% metaphosphoric acid and quantified by capillary electrophoresis in raw and fermented cabbages, as published in Frias, Miranda, Doblado, and Vidal-Valverde (2005). Results were expressed as mg of vitamin C per 100 g of dry matter (mg/100 g d.m.).

2.7. Oxygen radical antioxidant capacity (ORAC)

ORAC was determined in aqueous extracts from raw and fermented cabbage, as described in Peñas et al. (2011). Results were expressed as µmol trolox equivalents (TE) per gramme of dry matter (µmol TE/g d.m.).

2.8. Determination of Se-derived compounds

Total selenium concentration was determined in raw and fermented cabbages by ICP-MS (Thermo-X Series) after acid digestion in an analytical microwave oven (CEM MSP 1000, Matheus, NC), by following conditions described previously (Alzate et al., 2008; Ponce de León et al., 2002). Selenium speciation was carried out by HPLC-ICP-MS and previous enzymatic probe sonication (Pérez-Corona et al., 2011). Enzymatic hydrolysis was performed by 2 min of sonication (Sonoplus ultrasonic homogeniser Bandenlin, Germany) after addition of 20 mg of Protease XIV and 3 ml of Milli-Q water to 100 mg of dried sample. The obtained extracts were centrifuged at 15,557g for 30 min (4 °C) using 10 kDa cut-off filters (Millipore, USA). The ICP-MS instrument was coupled with a Hamilton PRP-X100 (250 × 4.1 mm, 10 µm) chromatographic column. The mobile phase was 10 mM ammonium citrate, pH 5.0, in 2% methanol, as mobile phase at a flow rate of 1 ml/min. Identification and quantification of selenium species was done by retention time and spiking experiments. Standard stock solutions of 1000 mg/l of SeMet, SeMeSeCys and SeCys₂ were prepared in ultra-pure Milli-Q water (Millipore, MA, USA), and 3% hydrochloric acid was added for better dissolution of SeCys₂ and SeMeSeCys. Inorganic selenium solutions were prepared by dissolving Na₂SeO₃ and Na₂SeO₄ in Milli-Q water.

2.9. Preparation of extracts for cell treatment

Extracts were prepared by homogenisation of 500 mg of freeze-dried sample in 20 ml of acetone:water solution (1/1), using an Ultra Turrax homogeniser T-25 Digital (Ika Werke GMBH & Co., Staufen, Germany), and centrifugation for 7 min at 3024g

and 5 °C. Supernatant was collected, and the pellet was extracted twice with 10 ml of acetone. Further, supernatants were combined, filtered using Whatman No. 1 paper and concentrated to 7 ml final volume. The concentrate was extracted twice with 15 ml of ethyl acetate. The combined organic layers were dried over anhydrous sodium sulphate, filtered, and evaporated under vacuum to dryness. Finally, the residue was dissolved in 0.1% DMSO.

2.10. Cell viability assay

Macrophages (cell line RAW 264.7) were cultured in DMEM containing 1% penicillin/streptomycin, and 10% fetal bovine serum at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. The cell proliferation assay was conducted, using the CellTiter 96 Aqueous One Solution Proliferation assay kit, with the novel tetrazolium compound, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS), and an electron coupling reagent, phenazine ethosulphate (PES). Briefly, 5×10^4 cells/well were seeded in a 96-well plate and the total volume was adjusted to 200 µl with DMEM. The cells were allowed to grow for 24 h at 37 °C in 5% CO₂. After 24 h of incubation, they were treated with different concentrations of raw and fermented cabbage extracts (0–150 µg/ml), ABG (0–1000 µM) and SeMeSeCys (0–10 µM) for 24 h. After treatment, DMEM was replaced by 100 µl of fresh medium and 20 µl of MTS/PES were added to each well. The plate was incubated for 2 h at 37 °C and the absorbance read at 490 nm. The percentage of viable cells was calculated with respect to cells treated with vehicle (0.1% DMSO) as follows: $A_{\text{treatment 490nm}}/A_{\text{control 490nm}} \times 100 = \% \text{ cell viability}$.

2.11. Measurement of nitric oxide (NO)

Approximately 5×10^4 cells/well were seeded in a 96-well plate and allowed to grow to 80–90% confluency. The cells were treated with 1 µg/ml of lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma), with or without different concentrations of raw and fermented cabbage extracts (0–150 µg/ml), ABG (0–1000 µM) and SeMeSeCys (0–10 µM), for 24 h. After this treatment, medium was collected and NO production analysed. Nitrite accumulation, an indicator of NO synthesis, was measured in the culture medium by the Griess reaction (Green et al., 1982). Briefly, 100 µl of DMEM were plated in a 96-well plate and an equal amount of Griess reagent, constituted of 1% (w/v) sulphanilamide and 0.1% (w/v) N-1-(naphthyl)ethylenediamine-diHCl in 2.5% (v/v) H₃PO₄, was added. The plate was incubated for 5 min and the absorbance measured at 550 nm in a microplate reader (Biotek, Winooski, VT, USA). The amount of NO was calculated using a sodium nitrite standard curve. Potency was determined by dose–response curves in which the range of concentrations was distributed in a logarithmic scale and the IC₅₀ values were calculated using non-linear regression sigmoidal curve fit functions in GraphPad Prism 4.00 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA).

2.12. Microbiological analyses

Microbiological analyses were performed on raw and fermented cabbage, as described by Peñas, Frias, Gomez, and Vidal-Valverde (2010). Briefly, 5 g of each sample were aseptically diluted in buffered peptone water (Scharlau Chemie, Spain) in a sterile Stomacher bag and homogenised for 1 min in a Stomacher laboratory blender (IUL Masticator, Barcelona, Spain). Further serial dilutions were made for plating. The pour plate technique was employed to determine the microbial counts. Total aerobic and anaerobic mesophilic bacteria were enumerated on Tryptone Soya Agar (TSA) after incubation in aerobic and anaerobic conditions, respectively, at 30 °C for 72 h, total and faecal coliforms on Violet Red Bile Agar (VRBA) containing lactose as carbohydrate source, after incubation at 37 °C and 44 °C, respectively, for 24 h, moulds and yeasts on Sabouraud-Chloramphenicol Agar, after incubation at 23 °C for 96 h, and lactic acid bacteria (LAB) on MRS Agar after incubation in anaerobic conditions at 30 °C for 24–48 h.

2.13. Statistical analysis

Data were expressed as means of three experiments. Results were compared by one-way analysis of variance (ANOVA), using the least significant differences ($P \leq 0.05$) (Statgraphic 5.0 software, Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, USA).

3. Results and discussion

3.1. Evolution of pH during cabbage fermentation

pH can be considered as an indicator of the success of fermentation processes (Johanningsmeier, McFeeters, Fleming, & Thompson, 2007). Raw cabbage (pH 6.2) was similar to our previously observed white cabbage cv. Bronco (Peñas et al., 2010). A rapid pH decrease took place up to 3 days of fermentation as a result of organic acid production by indigenous LAB in NF (pH 3.6) and NFSe (pH 3.7) cabbages, and it did not change up to 7 days of fermentation. Our results are consistent with previous studies in cabbages submitted to natural or induced fermentation using LAB starter cultures (Kohajdová, Karovicová, & Greifová, 2006; Peñas et al., 2010; Viander, Maki, & Palva, 2003). Moreover, selenite addition had no significant influence ($P \leq 0.05$) on pH evolution during sauerkraut production.

3.2. Effect of Se-enrichment on the content of indole GLS breakdown products in natural fermented cabbage

Raw cabbage showed small concentrations of indole GLS hydrolysis products, such as ABG, I3C and I3ACN, since cabbage was shredded immediately before analysis (Table 1). ABG concentration found in raw cabbage was within the range reported in previous studies (Martinez-Villaluenga et al., 2009; Peñas et al., 2010). However, no literature reports have been found about I3C and I3ACN content in raw white cabbage.

Table 1

Effects of Se enrichment on ascorbigen (ABG), indol-3-carbinol (I3C) and indol-3-acetonitrile (I3ACN) contents in natural fermented cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* cv. Megaton).^A

Cabbage	ABG (µmol/100 g d.m.)	I3C (µmol/100 g d.m.)	I3ACN (µmol/100 g d.m.)
Raw cabbage	16.4 ± 1.76 ^a	0.10 ± 0.04 ^a	0.24 ± 0.07 ^a
<i>Fermented cabbages</i>			
NF	218 ± 4.21 ^c	9.60 ± 0.76 ^b	2.66 ± 0.17 ^b
NFSe	205 ± 3.16 ^b	16.7 ± 0.99 ^c	3.00 ± 0.17 ^c

^A Mean values ± standard deviation of three experiments. The same letter in the same column indicates no significant difference ($P \leq 0.05$).

During natural fermentation, the content of indole GLS hydrolysis products markedly increased ($P \leq 0.05$), ABG being the major indole GLS-derived compound found in NF cabbage (Table 1), followed by I3C, and I3ACN. The content of indole GLS-derived products in NF cabbage differed from that in previous studies (Ciska & Pathak, 2004; Ciska, Verkerk, & Honke, 2009; Martinez-Villaluenga et al., 2009; Peñas et al., 2010) which could be attributed to differences in glucobrassicin concentration and myrosinase activity as they depend on genetic and environmental factors that vary among growing locations and year of cultivation (Peñas et al., 2011; Rosa, Hesney, Fenwick & Portas, 1997).

NFSe cabbages showed significantly lower ABG content but higher I3C and I3ACN concentrations ($P \leq 0.05$), when compared to NF cabbages (Table 1). No previous studies have been found on the effect of Se on the formation of GLS hydrolysis products during cabbage fermentation. Indole GLS breakdown products are considered anticarcinogenic agents that are associated with lower risk of breast (Fowke et al., 2003) and colon cancer (Bonnesen, Eggleston, & Hayes, 2001). Furthermore, ABG exert important immunomodulating actions (Preobrazhenskaya, Bukhman, Korolev, & Efimov, 1993) while I3C promote cell cycle arrest in endometrial (Kojima, Tanaka, & Mori, 1994) and prostate tumours (Souli, Machluf, Morgenstern, Sabo, & Yannai, 2008).

3.3. Effect of Se-enrichment on ascorbic acid content of natural fermented cabbage

Raw cabbage presented a high vitamin C content (Table 2), in agreement with previous studies (Martinez-Villaluenga et al., 2009; Peñas et al., 2010; Peñas et al., 2011). Ascorbic acid content decreased by more than 25% in NF cabbage compared to raw cabbage. This reduction could be explained by ABG formation which results from the hydrolysis of glucobrassicin by myrosinase and the further reaction with L-ascorbic acid at low pH (Hrncirik, Valusek, & Velisek, 1998) and the oxidation of ascorbic acid during cabbage fermentation. Vitamin C level, found in the present work, was consistent with our previous studies (Martinez-Villaluenga et al., 2009; Peñas et al., 2010). Fermentation in the presence of Se caused a small but significant ($P \leq 0.05$) decrease of vitamin C in NFSe cabbage. No information was found about the effect of Se on ascorbic acid content in sauerkraut.

3.4. Biotransformation of selenite during natural fermentation of white cabbage

Table 2 collects the content of Se compounds in raw, NF and NFSe cabbages. Total Se contents in raw and NF cabbage were 0.04 and 0.07 $\mu\text{g/g d.m.}$, respectively, and Se species concentrations were below the quantification limit. Selenite addition into cabbage caused a 19.5-fold increase of total Se concentration up to 1.29 $\mu\text{g/g d.m.}$ (equivalent to 11.6 $\mu\text{g}/100 \text{ g f.w.}$) and Se-methylselenocysteine (SeMeSeCys) was the major Se species found

Table 2
Effect of Se enrichment on ascorbic acid, Se biotransformation and water content in natural fermented cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* cv. Megaton).^A

Cabbages	Ascorbic acid (mg/ 100 g d.m.)	Se ($\mu\text{g/g d.m.}$)	SeMeSeCys ($\mu\text{g/g d.m.}$)	Water (%)
Raw cabbage	330 \pm 8.95 ^c	0.04 \pm 0.01 ^a	ND ^a	91.6
<i>Fermented cabbages</i>				
NF	242 \pm 8.4 ^b	0.07 \pm 0.01 ^b	ND ^a	91.5
NFSe	230 \pm 8.50 ^a	1.29 \pm 0.04 ^c	0.74 \pm 0.02 ^b	91.4

^A Mean values \pm standard deviation of three experiments. The same letter in the

in Se-enriched sauerkraut. Therefore, the consumption of one serving of 150 g f.w. of Se-enriched sauerkraut would contribute a relevant percentage of Se RDA (43.6% for men and 58.1% for women). With regard to safety, an upper limit of the safe adult population mean intake of selenium has been established as 400 $\mu\text{g Se/day}$ (WHO/FAO/IAEA, 1996). A Se-enriched sauerkraut serving of 150 g f.w. contains 17.4 $\mu\text{g Se}$, within the safe range of Se intake.

After enzymatic hydrolysis using protease XIV, samples were ultrafiltered through 10 kDa cutoff membranes. The Se recovery in ultrafiltered cabbage hydrolysates was $90 \pm 3\%$. The same extraction procedure was applied without protease (aqueous extraction), providing recovery values of $60 \pm 3\%$. These results suggested that most of the Se in samples was not bound to proteins. Fig. 1 shows the chromatographic profiles of selenium species standards (Fig. 1A) and the raw, NF, NFSe cabbage hydrolysates (Fig. 1B). It is noteworthy that SeMeSeCys was found during fermentation in the presence of selenite. SeMeSeCys was also the main Se-compound found when samples were treated by aqueous extraction. SeMeSeCys is a non-proteinogenic selenoamino acid which is metabolised by lyase to methylselenol *in vivo* (Ganther & Lawrence, 1997). This fact is very important because there is evidence that endogenous production of monomethylated selenium is a critical factor in Se chemoprotection. Recently, Cuello et al. (2007) have reported that SeMeSeCys protects human hepatoma cells against oxidative stress.

The ability of some microorganisms to biotransform inorganic Se has been widely reported in the literature, especially *S. cerevisiae*. Yeasts are being used as Se supplements because of their ability to accumulate and biotransform high concentrations of inorganic selenium (3000 $\mu\text{g/g}$), mainly into selenomethionine (SeMet) (Ponce de León et al., 2002; Pérez-Corona et al., 2011). Thus, several authors have reported preparation of selenised foodstuffs mediated by a fermentation process (Alzate et al., 2008; Pérez-Corona et al., 2011). Alzate et al. (2008) compared the different Se species that are produced when lactic fermentation, in the presence of two different types of microorganisms, LAB (*Lactobacillus*) and yeast (*Saccharomyces*), takes place to produce yogurt and kefir, respectively. Se organic species formed depended on the type of microorganism involved in the fermentation process, SeCys₂ and SeMeSeCys being the main Se species generated by *Lactobacillus* and SeMet by *Saccharomyces*. These results are in agreement with those reported in the present work, and others previously published, supporting the different behaviours of microorganisms, such as *Lactobacillus* (Andreoni, Luischi, Calvaca, Erba & Ciapellano, 2000; Calome, Vand den Branden, & Vanden Berghe, 1995) and *Saccharomyces*, when exposed to inorganic Se (Ponce de León et al., 2002).

Results illustrated in Table 2 evidence that up to 50% of the total Se content found in Se-enriched sauerkraut was identified as SeMeSeCys. This Se species was not found in raw cabbage, which again suggests that its production is derived from the action of the microorganisms during the fermentation process in the presence of inorganic Se.

3.5. Effect of Se-enrichment on the antioxidant capacity of natural fermented cabbage

The antioxidant activity of raw cabbage was 75 $\mu\text{mol TE/g d.m.}$. Natural fermentation (NF) led to a 1.75-fold increase (Table 3) in agreement with previous literature data (Bartoszek, Forc, & Grzeskowiak, 2002). This effect can be attributed to the formation of GLS-derivatives during fermentation which act as direct antioxidant compounds (Barillari et al., 2005). Other factors also contribute to the enhanced antioxidant activity found in sauerkraut compared to raw cabbage. According to Reyes, Villarreal, and Cisneros-Zevallos (2007), the antioxidant activity of cabbage increases during wounding, an effect that takes place after

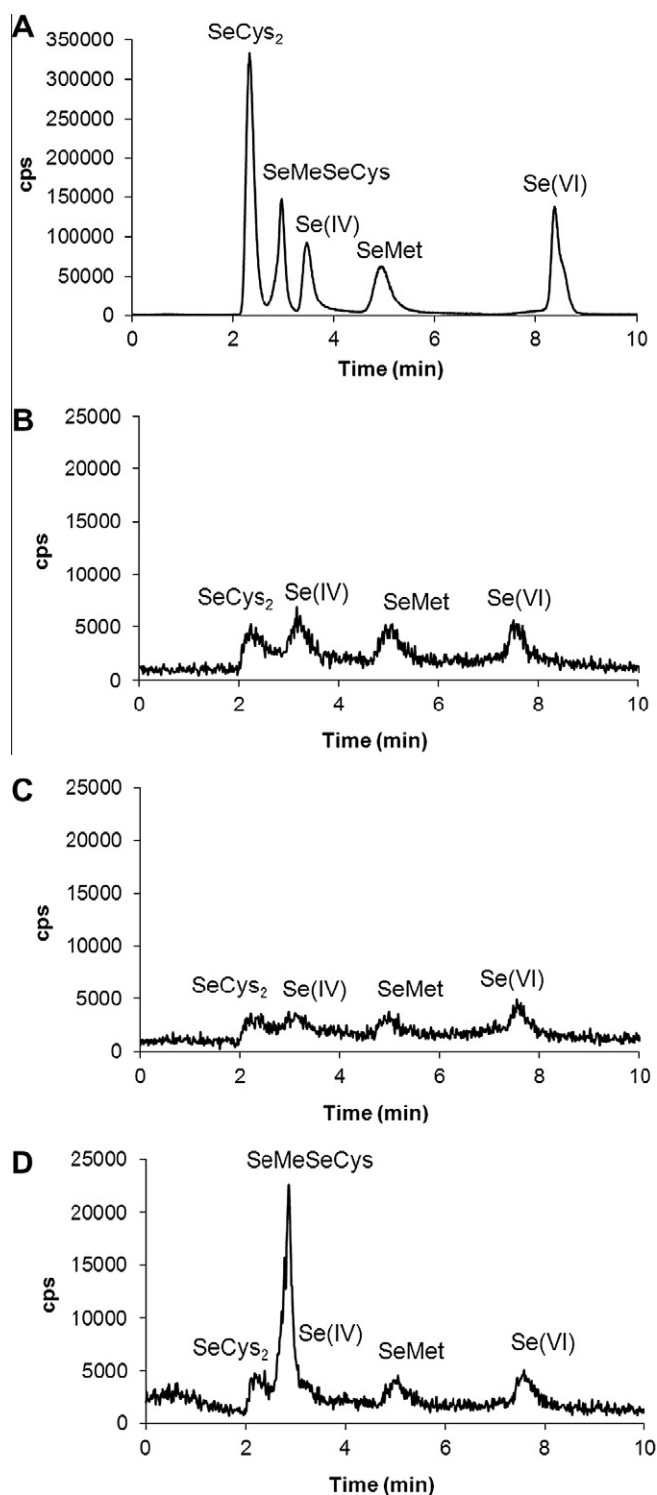


Fig. 1. Chromatographic profile obtained by anion-exchange LC-ICP-MS of a mixture of Se standards containing 100 µg/l of each Se species (A); enzymatic extraction of raw cabbage (B), NF cabbage (C) and NFSe cabbage (D).

shredding during cabbage fermentation. Additionally, LAB may also affect the antioxidant activity exhibited by the fermented cabbage, as has been previously suggested by Kusznierevicz, Smiechowska, Bartoszek, and Namiesnik (2008).

Fermentation in the presence of Se significantly improved ($P \leq 0.05$) antioxidant activity in sauerkraut (Table 3). The higher antioxidant activity of NFSe cabbage than of NF cabbage may be

related to the biotransformation of selenite in Se-organic species, which are able to scavenge free radicals (Flohe, 1985).

3.6. Effect of Se-enrichment on microbiological quality of sauerkraut

Microbial counts of raw, NF and NFSe cabbage are shown in Table 4. The dominating microbial population of raw cabbage was aerobic mesophilic bacteria, followed by anaerobic bacteria, LAB and total coliforms. Faecal coliforms, moulds and yeasts were not detected in raw cabbage. These results are consistent with those recently reported for other *Brassica* vegetables (Olarite, Sanz, Echávarri, & Ayala, 2009) and white cabbage cv. Bronco (Peñas et al., 2010).

Fermentation caused a significant ($P \leq 0.05$) increase of aerobic and anaerobic mesophilic bacteria, as well as LAB, in NF cabbage; however, microbial counts of faecal coliforms, moulds and yeasts did not change after fermentation (Table 4). LAB grew to a greater extent than did other microbial populations, due to the favourable ecological conditions (acidic pH and low oxygen concentration) that occur during cabbage fermentation, enhancing their multiplication and inhibiting the growth of other microorganisms, such as aerobic mesophilic bacteria. Slightly lower counts of aerobic mesophilic bacteria and LAB were found in sauerkraut obtained by spontaneous fermentation from white cabbage cv. Bronco (Peñas et al., 2010), probably due to differences in endogenous microflora.

The addition of Se during cabbage fermentation caused significantly ($P \leq 0.05$) lower aerobic and anaerobic mesophilic bacteria counts and significantly ($P \leq 0.05$) higher LAB counts. These findings suggest that Se-enrichment enhanced the growth of LAB and, consequently, other microbial populations decreased, most likely due to a competition phenomenon. Recently, Molan, Flanagan, Wei, and Moughan (2009) reported that inorganic forms of Se (selenate and selenite) exert a prebiotic effect as evidenced by their ability to promote the growth of *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium breve* in vitro. Furthermore, these authors found that Se-enriched green tea enhanced lactobacilli growth compared to conventional green tea.

3.7. Effect of raw and fermented cabbage extracts on NO production in LPS-induced RAW 264.7 macrophages

The cytotoxicities of raw and NF and NFSe cabbage extracts in LPS-induced macrophages were evaluated in a range 0–150 µg extract/ml using MTS reduction assay after 24 h of incubation. Macrophages exhibited a survival percentage of >87% when treated with raw and fermented cabbage extracts at concentrations ≤ 150 µg/ml. Therefore, these results indicated that the range of concentrations used in this study to treat the cells did not exert any cytotoxic effect. In activated macrophages, NO production noticeably increased in response to LPS (Fig. 2). Excessive production of NO in macrophages represents a potentially toxic effect which, if not counteracted, causes the onset and/or progression of many disease pathologies (Evans, Hirsch, & Dushenkov, 2006). Therefore, the effect of raw, NF and NFSe cabbage extracts on inhibition of NO production was examined to study their potential anti-inflammatory effect. Raw, NF and NFSe cabbage extracts induced a significant ($P \leq 0.05$) dose-dependent suppression of NO production (Fig. 2A). Table 3 shows the calculated concentrations of raw, NF and NFSe cabbage extracts that resulted in 50% inhibition of NO production in LPS-induced macrophages (IC_{50}). NF cabbage extract exhibited higher ($P \leq 0.05$) potency ($IC_{50} = 84.0$ µg/ml) than did raw cabbage extract ($IC_{50} = 168$ µg/ml). This effect could be due to formation of bioactive compounds, such as GLS breakdown products, exhibiting anti-inflammatory properties during sauerkraut manufacture. ABG was the major GLS hydrolysis compound in NF cabbage (Table 1), therefore, we

Table 3Effects of Se enrichment on antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of natural fermented cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* cv. Megaton).^A

Cabbage	Antioxidant capacity ($\mu\text{mol trolox/g d.m.}$)	Inhibitory potency (IC_{50}) of NO production ($\mu\text{g extract/ml}$)
Raw cabbage	74.8 ± 0.28^a	168 ± 16.09^c
<i>Fermented cabbages</i>		
NF	132 ± 13.95^b	84.0 ± 8.50^b
NFSe	163 ± 3.71^c	44.0 ± 1.39^a

^A Mean values \pm standard deviation of three experiments. The same letter in the same column indicates no significant difference ($P \leq 0.05$). IC_{50} is the concentration of cabbage extract ($\mu\text{g extract/ml}$) that resulted in 50% inhibition of NO production.

Table 4Effects of Se enrichment on microbiological quality (log cfu/g f.w.) of natural fermented cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* cv. Megaton).^A

Cabbage	Aerobic mesophilic bacteria	Anaerobic mesophilic bacteria	Lactic acid bacteria	Total coliforms	Faecal coliforms	Yeasts and moulds
Raw cabbage	5.19 ± 0.11^a	4.38 ± 0.11^a	2.42 ± 0.11^a	1.17 ± 0.18^b	$<1^a$	$<1^a$
<i>Fermented cabbages</i>						
NF	6.78 ± 0.10^c	6.75 ± 0.11^c	6.70 ± 0.14^b	$<1^a$	$<1^a$	$<1^a$
NFSe	6.25 ± 0.11^b	6.28 ± 0.13^b	6.92 ± 0.10^c	$<1^a$	$<1^a$	$<1^a$

^A Mean values \pm standard deviation of three experiments. The same letter in the same column indicates no significant difference ($P \leq 0.05$).

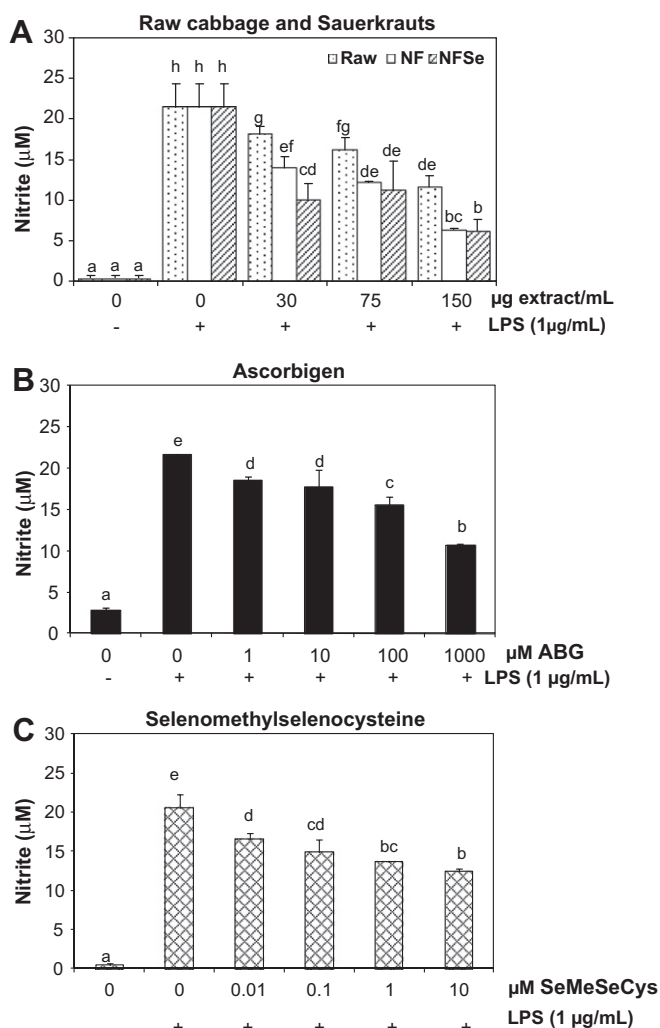


Fig. 2. Effects of different concentrations of raw, NF and NFSe cabbage extracts (A), ABG (B), and SeMeSeCys (C) on NO production in LPS-induced macrophages, RAW 264.7 cells. Data represent the means \pm standard deviation of triplicates from three independent experiments. The same letter in the same bar indicates no significant difference ($P \leq 0.05$).

further investigated the potential NO production inhibitory effect of synthetic ABG in LPS-induced macrophages. The cytotoxicity of ABG was first examined after 24 h of incubation. Macrophages exhibited a viability $>92\%$ which indicated that ABG did not induce any cytotoxic effect at concentrations $\leq 1000 \mu\text{M}$. ABG was able to significantly ($P \leq 0.05$) reduce NO production in a dose-dependent manner (Fig. 2B), however, ABG was a weak inhibitor of NO production in LPS-activated macrophages ($\text{IC}_{50} = 971 \mu\text{M}$). These results suggest that ABG make a small contribution ($<10\%$) to the NO production inhibitory potency, indicating that other bioactive compounds would be responsible for the observed biological activity of fermented cabbage extracts. A small body of literature suggests that I3C and sulforaphane (SF) may protect against inflammation, inhibiting cytokine production (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8) and expression of proinflammatory enzymes, such as inducible nitric oxide synthase (iNOS) (Cho et al., 2008; Thimmulappa, Mai, Srisuma, Kensler, Yamamoto & Biswal, 2002). Therefore, it will be interesting to see if ABG, SF and I3C have synergistic effects in fighting inflammation.

Selenite addition (1.6 mg Se/kg d.m.) markedly improved the NO production inhibitory potency of fermented cabbage ($\text{IC}_{50} = 44 \mu\text{g extract/ml}$). To further confirm the role of Se in the modulation of inflammatory response, we tested the effect of SeMeSeCys, the major Se species found in NFSe cabbage, on NO production in LPS-activated macrophages. Treatment with SeMeSeCys (concentration range 0–10 μM) caused a dose-dependent inhibition of NO production in LPS-activated macrophages (Fig. 2C) and showed no cytotoxicity at concentrations $\leq 10 \mu\text{M}$. SeMeSeCys potency to inhibit 50% NO production in LPS-activated macrophages (IC_{50}) was 25.2 μM (equivalent to 10.9 μM Se). This level of Se represents a serum-achievable concentration of total Se and is less than the lower 95% confidence limit of the non-observed adverse effect level (NOAEL) (Institute of Medicine., 2000). Taking into consideration SeMeSeCys content in Se-enriched sauerkraut, as well as NO production inhibitory potency (IC_{50}) of Se-enriched sauerkraut and pure SeMeSeCys, it was estimated that this compound makes a relative contribution of 38% to the IC_{50} value. These results suggest that SeMeSeCys could be acting synergistically with other compounds present in Se-enriched fermented cabbage. Our results agree with reports demonstrating the effect of Se on attenuation of proinflammatory response in various cell lines (Chen et al., 2009). Several studies have been consistent showing the ability of Se in the regulation of expression of the proinflammatory enzymes iNOS and cyclooxygenase 2 (COX-2) through inactivation of the nuclear transcription factor B (NF- κB)

(Christensen, Nartey, Hada, Legg, & Barzee, 2007; Rabasco et al., 2010). Therefore, downregulation of proinflammatory gene expression by Se explains the inhibition of NO production in LPS-induced macrophages shown in the present study.

In conclusion, the addition of sodium selenite during natural cabbage fermentation enhanced the formation of some GLS breakdown compounds that exhibit health-promoting properties, and increased the antioxidant and potential anti-inflammatory activities of sauerkraut. On the other hand, SeMeSeCys was the primary seleno compound observed in the resulting Se-enriched sauerkraut. Consequently, the consumption of Se-enriched sauerkraut would contribute the Se dietary intake and it could be considered as a good source of health-promoting compounds.

Acknowledgements

The CSIC group acknowledges the financial support to the Spanish Commission of Science and Technology (CICYT), Project number AGL2007-62044. The Complutense University group acknowledges the Spanish Commission of Science and Technology (CTQ-2008-05925), the Comunidad Autónoma de Madrid (Spain) and European funding from FEDER programme (Project S2009/AGR-1464, ANALI-SYC-II). E. P. is indebted to a JAE-doc Grant funded by CSIC.

References

- Alzate, A., Fernández-Fernández, A., Pérez-Conde, C., Gutiérrez, A. M., & Cámara, C. (2008). Comparison of biotransformation of inorganic selenium by *Lactobacillus* and *Saccharomyces* in lactic fermentation process of yogurt and kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8728–8736.
- Andreoni, V., Luischi, M. M., Calvaca, L., Erba, D., & Ciapellano, S. (2000). Selenite tolerance and accumulation in *Lactobacillus* species. *Annals of Microbiology*, 50, 77–88.
- Barillari, J., Canistro, D., Paolini, M., Ferroni, F., Pedulli, G. F., Lori, R., & Valgimigli, L. (2005). Direct antioxidant activity of purified glucorucin, the dietary secondary metabolite contained in rocket (*Eruca sativa* Mill.) seeds and sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2475–2482.
- Bartoszek, A., Forc, A., & Grzeskowiak, J. (2002). Antioxidative properties of some vegetable products traditional for diets in Central Europe – Short Report. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 11, 67–70.
- Behne, D., Alber, D., & Kyriakopoulos, A. (2010). Long-term selenium supplementation of humans: Selenium status and relationships between selenium concentrations in skeletal muscle and indicator materials. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24, 99–105.
- Bonnesen, C., Eggleston, I. M., & Hayes, J. D. (2001). Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Research*, 61, 6120–6130.
- Calome, M. R., Vand den Branden, K., & Vanden Berghe, D. A. (1995). Selenium and *Lactobacillus* species. *Journal of Applied Bacteriology*, 79, 331–340.
- Chen, Y.-C., Sosnoski, D. M., Gandhi, U. H., Novinger, L. J., Prabhu, K. S., & Mastro, A. M. (2009). Selenium modifies the osteoblast inflammatory stress response to bone metastatic breast cancer. *Carcinogenesis*, 30, 1941–1948.
- Cho, H., Seon, M., Lee, Y., Kim, J., Kim, S. G., & Park, J. H. Y. (2008). 3,3'-Diindolylmethane suppresses the inflammatory response to lipopolysaccharide in murine macrophages. *The Journal of Nutrition*, 138, 17–23.
- Christensen, M. J., Nartey, E. T., Hada, A. L., Legg, R. L., & Barzee, B. R. (2007). High selenium reduces NF- κ B-regulated gene expression in uninduced human prostate cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 58, 197–204.
- Ciska, E., & Pathak, D. (2004). Glucosinolate derivatives in stored fermented cabbage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7938–7943.
- Ciska, E., Verkerke, R., & Honke, J. (2009). Effect of boiling on the content of ascorbigen, indol-3-carbinol, indol-3-acetonitrile, and 3,3'-diindolylmethane in fermented cabbage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2334–2338.
- Cuello, S., Ramos, S., Mateos, R., Martín, M. A., Madrid, Y., Cámara, C., Bravo, L., & Goya, L. (2007). Selenium methylselenocysteine protects human hematoma HepG2 cells against oxidative stress induced by tert-butyl 6 hydroperoxide. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 2167–2178.
- Das, S., Tuagi, A. K., & Haur, H. (2000). Cancer modulation by glucosinolates: A review. *Current Science*, 79, 1665–1671.
- Dietary reference intakes (DRI). 2000. *National Research Council* (pp. 284–319). Washington: National Academy Press.
- Evans, D. A., Hirsch, J. B., & Dushenkov, S. (2006). Phenolics, inflammation and nutrigenomics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2503–2509.
- Flohe, L. (1985). The glutathione peroxidase reaction: Molecular basis of the antioxidant functions of selenium in mammals. *Current Topics in Cell Regulation*, 27, 473–478.
- Fowke, J. H., Chung, F. L., Jin, F., Qi, D., Cai, Q., Conoway, C., Cheng, J. R., Shu, X. O., Gao, Y. T., & Zheng, W. (2003). Urinary isothiocyanate levels, brassica, and human breast cancer. *Cancer Research*, 63, 3980–3986.
- Frias, J., Miranda, L. M., Doblado, R., & Vidal-Valverde, C. (2005). Effect of germination and fermentation on the antioxidant vitamin content and antioxidant capacity of *Lupinus albus* L. var. *multolupa*. *Food Chemistry*, 92, 211–220.
- Ganther, H. E., & Lawrence, J. R. (1997). Chemical transformations of selenium in living organisms. Improved forms of selenium for cancer prevention. *Tetrahedron*, 53, 12299–12310.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 26, 131–138.
- Harmaum, B., Hubbermann, E. M., Zhu, Z., & Schwarz, K. (2008). Impact of fermentation on phenolic compounds in leaves of pak choi (*Brassica L. ssp. chinensis* var. *communis*) and Chinese leaf mustard (*Brassica juncea* coss). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 148–157.
- Hartikainen, H. (2005). Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18, 309–318.
- Hrnčirik, K., Valusek, J., & Velisek, J. (1998). A study on the formation and stability of ascorbigen in an aqueous system. *Food Chemistry*, 63, 349–356.
- Hu, Y., McIntosh, G. H., Le Leu, R. K., & Young, G. P. (2010). Selenium-enriched milk proteins and selenium yeast affect selenoprotein activity and expression differently in mouse colon. *British Journal of Nutrition*, 104, 17–23.
- Institute of Medicine. (2000). *Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids* (pp. 311–315). Washington: National Academy Press.
- Johanningsmeier, S., McFeeters, R. F., Fleming, H. P., & Thompson, R. L. (2007). Effects of *Leuconostoc mesenteroides* starter culture on fermentation of cabbage with reduced salt concentrations. *Journal of Food Science*, 72, 166–172.
- Johnson, I. T. (2002). Glucosinolates in the human diet. Bioavailability and implications for health. *Phytochemistry Reviews*, 1, 183–188.
- Kohajdová, Z., Karovicová, J., & Greifová, M. (2006). Lactic acid fermentation of some vegetable juices. *Journal of Food and Nutrition Research*, 45, 115–119.
- Kojima, T., Tanaka, T., & Mori, H. (1994). Chemoprevention of spontaneous endometrial cancer on female Donryku rats by dietary indole-3-carbinol. *Cancer Research*, 5, 1446–1449.
- Kusznierewicz, B., Smiechowska, A., Bartoszek, A., & Namiesnik, J. (2008). The effect of heating and fermenting on antioxidant properties of white cabbage. *Food Chemistry*, 108, 853–861.
- Martinez-Villaluenga, C., Peñas, E., Frias, J., Ciska, E., Honke, J., Piskula, M. K., Kozłowska, H., & Vidal-Valverde, C. (2009). Influence of fermentation conditions on glucosinolates, ascorbigen, and ascorbic acid content in white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* cv. Taler) cultivated in different seasons. *Journal of Food Science*, 74, C62–C67.
- Mithen, R. F. (2001). Glucosinolates and their degradation products. *Advances in Botanical Research*, 35, 213–262.
- Molan, A. L., Flanagan, J., Wei, W., & Moughan, P. J. (2009). Selenium-containing green tea has higher antioxidant and prebiotic activities than regular green tea. *Food Chemistry*, 114, 829–835.
- Navarro-Alarcon, M., & Cabrera-Vique, C. (2008). Selenium in food and the human body: A review. *Science of the Total Environment*, 400, 115–141.
- Olarte, C., Sanz, S., Echávarri, J. F., & Ayala, F. (2009). Effect of plastic permeability and exposure to light during storage on the quality of minimally processed broccoli and cauliflower. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 402–411.
- Pan, M.-H., Lai, C.-S., Dushenkov, S., & Ho, C.-T. (2009). Modulation of inflammatory genes by natural dietary bioactive compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4467–4477.
- Peñas, E., Frias, J., Sidro, B., & Vidal-Valverde, C. (2010). Chemical evaluation and sensory quality of sauerkrauts obtained by natural and induced fermentations at different NaCl levels from *Brassica oleracea* var. *capitata* cv. Bronco grown in Eastern Spain. Effect of storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3549–3557.
- Peñas, E., Frias, J., Gomez, R., & Vidal-Valverde, C. (2010). High hydrostatic pressure can improve the microbial quality of sauerkraut during storage. *Food Control*, 21, 524–528.
- Peñas, E., Frias, J., Martinez-Villaluenga, C., & Vidal-Valverde, C. (2011). Bioactive compounds, myrosinase activity and antioxidant capacity of white cabbages grown in different locations of Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3772–3779.
- Pérez-Corona, M. T., Sánchez-Martínez, M., Valderrama, M. J., Rodríguez, M. E., Cámara, C., & Madrid, Y. (2011). Se Biotransformation by *Saccharomyces cerevisiae* and *S. bayanus* during white wine manufacture: Lab-scale experiments. *Food Chemistry*, 124, 1050–1055.
- Ponce de León, C. A., Bayón, M. M., Paquín, C., & Caruso, A. (2002). Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: A study of different incorporation methods. *Journal of the Applied Microbiology*, 92, 602–610.
- Preobrazhenskaya, M. N., Bukhman, V. M., Korolev, A. M., & Efimov, S. A. (1993). Ascorbigen and other indole-derived compounds from Brassica vegetables and their analogs as anticarcinogenic and immunomodulating agents. *Pharmacology and Therapeutics*, 60, 301–313.
- Rabasco, P. et al. (2010). Colorectal cancer: Can nutrients modulate NF- κ B and apoptosis? *Clinical Nutrition*, 29, 42–46.
- Rayman, M. P. (2008). Food-chain selenium and human health: Emphasis on intake. *British Journal of Nutrition*, 100, 254–268.

- Reid, M. E., Duffield-Lillico, A. J., Slate, E., Natarajan, N., Turnbull, B., Jacobs, E., Combs, G. F., Clark, L. C., & Marshall, J. R. (2008). The nutritional prevention of cancer: 400 mcg per day selenium treatment. *Nutrition and Cancer*, 60, 155–163.
- Reyes, L. F., Villarreal, J. E., & Cisneros-Zevallos, L. (2007). The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue. *Food Chemistry*, 101, 1254–1262.
- Rosa, E. A. S., Hesney, R. K., Fenwick, G. R., & Portas, C. (1997). Glucosinolates in crop plants. *Horticultural Reviews*, 19, 99–215.
- Souli, E., Machluf, M., Morgenstern, A., Sabo, E., & Yannai, S. (2008). Indole-3-carbinol (I3C) exhibits inhibitory and preventive effects on prostate tumours in mice. *Food Chemistry and Toxicology*, 46, 815–828.
- Stranges, P., Nava-Acien, A., Rayman, M. P., & Guallar, E. (2010). Selenium status and cardiometabolic health: State of the evidence. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 20, 754–760.
- Thimmulappa, R. K., Mai, K. H., Srisuma, S., Kensler, T. W., Yamamoto, M., & Biswal, S. (2002). Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Research*, 62, 5196–5203.
- Viander, B., Maki, M., & Palva, A. (2003). Impact of low salt concentration, salt quality on natural large-scale sauerkraut fermentation. *Food Microbiology*, 20, 391–395.
- WHO/FAO/IAEA. (1996). Trace elements in human nutrition and Health. Geneva: World Health Organization, 1996.

V. CAPÍTULO 3. ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL SELENIO EN RATAS ALIMENTADAS CON PRODUCTOS ENRIQUECIDOS EN SELENIO

La importancia del selenio reside en sus propiedades beneficiosas para la salud, sin embargo todavía quedan por conocerse muchos detalles respecto a cómo interviene en procesos biológicos. Con este fin, el estudio del metabolismo del selenio en el organismo, una vez ingerido, es de gran importancia. En esta línea, se han realizado multitud de estudios con animales suplementados con selenio, pudiendo existir diferencias en los resultados obtenidos dependiendo del animal de experimentación empleado y de la especie de selenio y concentración suministrada. También se ha llevado a cabo la determinación de selenio en suero y orina de individuos suministrados con selenio, aunque esos estudios son menos frecuentes.

El desarrollo de alimentos funcionales enriquecidos en selenio es una línea de investigación muy actual que aún se está explorando. Además de su uso más evidente, que es la suplementación para evitar la carencia de este elemento, también se utilizan para estudiar el metabolismo del selenio en los seres vivos una vez que éstos ingieren dichos alimentos, con el objetivo de ver su efecto en los mismos.

A este aspecto se dedica el trabajo de investigación presentado en este capítulo (**“*Synthesis of ⁷⁷Se-methylselenocysteine when preparing sauerkraut in presence of ⁷⁷Selenite. Metabolism of ⁷⁷Se-methylselenocysteine in Wistar rats determined by LC-ID-ICP-MS*”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Enviado**), el cual es fruto nuevamente de la colaboración con el Departamento de Microbiología del ICTAN del CSIC de Madrid, esta vez con la participación del Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos (INTA) del Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM) de Granada. En él se utilizó el marcaje isotópico para seguir la ruta metabólica del selenio ingerido por ratas *Wistar* a las que se les suministró una dieta rica en selenio a base de pienso con un 20% de chucrut enriquecido con ⁷⁷SeMeSeCys, el cual fue obtenido de la misma forma que se hizo en el trabajo de la sección V.2.1. Esta

herramienta sirvió para discernir entre el selenio proveniente del chucrut marcado constituyente del pienso, y el del pienso control.

La suplementación con chucrut selenizado aumentó de manera destacada el contenido de selenio en órganos como el riñón, corazón o el hígado, sin influir en otros órganos como el cerebro o los testículos. La extracción de especies se optimizó utilizando distintas metodologías consistentes en hidrólisis enzimáticas o en procesos de reducción-metilación previos (carbamidometilación), los cuales permiten extraer y proteger especies inestables, como es el caso de la selenocisteína, principal componente de las selenoproteínas. Estos tratamientos unidos al uso de distintos mecanismos de separación cromatográfica (intercambio aniónico, PRP-X100, y fase inversa, Zorbax-C8) acoplados al ICP-MS permitieron identificar la SeCys como una de las especies presentes en todos los órganos estudiados. Sin embargo, mediante la carbamidometilación seguida de hidrólisis enzimática, se extrajo una especie desconocida. La incapacidad para identificar esta especie con las herramientas disponibles, como es ESI-MS/MS, no hubiera permitido su cuantificación de no ser por la aplicación de la técnica de dilución isotópica post-columna, con la que pueden cuantificarse simultáneamente tanto las especies conocidas como las desconocidas.

En el estudio del metabolismo del selenio, también es importante saber si una ingesta adicional del mismo pudiese producir variaciones en otros elementos esenciales para el organismo, motivo por el cual se llevó a cabo el análisis de algunos micronutrientes habitualmente ingeridos a través de la dieta como el magnesio (Mg), zinc (Zn), molibdeno (Mo) y cobre (Cu), observándose que en los órganos donde mayor era el aumento de selenio tras la suplementación, más se acumulaban los demás metales. A pesar de que los motivos para este fenómeno no están muy esclarecidos, se han observado en otros estudios y se cree que se debe a la participación de los elementos esenciales en el sistema redox del organismo, lo cual hace que la alteración de uno de los elementos provoque la modificación de los restantes con el objeto de mantener el equilibrio.

V.3.1. SÍNTESIS DE ^{77}Se SELENOMETILSELENOCISTEÍNA DURANTE LA PREPARACIÓN DE CHUCRUT EN PRESENCIA DE ^{77}Se SELENITO. DETERMINACIÓN DEL METABOLISMO DE ^{77}Se SELENOMETILSELENOCISTEÍNA EN RATAS WISTAR POR LC-ID-ICP-MS.

“Synthesis of ^{77}Se -methylselenocysteine when preparing sauerkraut in presence of ^{77}Se Selenite. Metabolism of ^{77}Se -methylselenocysteine in Wistar rats determined by LC-ID-ICP-MS”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Enviado.

Parte de este trabajo fue presentado en:

“European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry”, Cracovia, Polonia. Febrero, 2013.

“XVIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica, VI Reunión de la Sociedad Española de Espectrometría de Masas”, Úbeda, España. Junio, 2013.



Synthesis of ^{77}Se -methylselenocysteine when preparing sauerkraut in presence of ^{77}Se selenite. Metabolism of ^{77}Se -methylselenocysteine in Wistar rats determined by LC-ID-ICP-MS



Journal:	<i>Analytical and Bioanalytical Chemistry</i>
Manuscript ID:	Draft
Type of Paper:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Sanchez-Martinez, Maria; Universidad Complutense, Facultad de ciencias Químicas,, Departamento de Química Analítica</p> <p>Perez-Corona, M Teresa; Universidad Complutenses, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Analítica</p> <p>Martínez-Villaluenga, Cristina; Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC)</p> <p>Frias, Juana; Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC)</p> <p>Peñas, Elena; Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC)</p> <p>Porres, Jesus M; University of Granada. School of Pharmacy, Department of Physiology</p> <p>Urbano, Gloria; University of Granada. School of Pharmacy, Department of Physiology</p> <p>Cámara, Carmen; Complutense University, Analytical Chemistry</p> <p>Madrid-Albarrán, Yolanda; Universidad Complutense, Facultad de ciencias Químicas, Departamento de Química Analítica</p>
Keywords:	Mass spectrometry / ICP-MS, Speciation, HPLC, Inorganic compounds / Trace inorganic compounds, Foods / Beverages

Synthesis of ^{77}Se -methylselenocysteine when preparing sauerkraut in presence of ^{77}Se selenite. Metabolism of ^{77}Se -methylselenocysteine in Wistar rats determined by LC-ID-ICP-MS

María Sánchez-Martínez¹, Teresa Pérez-Corona¹, Cristina Martínez-Villaluenga², Juana Frías², Elena Peñas², Jesús M. Porres³, Gloria Urbano³, Carmen Cámara¹, Yolanda Madrid*¹

¹Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid. Av. Complutense s/n, 28040, Madrid, Spain

²Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006, Madrid, Spain

³Department of Physiology, School of Pharmacy, University of Granada, Campus Universitario de Cartuja s/n, 18071, Granada, Spain

*Corresponding Author: ymadrid@ucm.es

Fax number: +34 913944329. Phone number: +34 91 3945145

Abstract

The use of enriched Se isotopes as tracers has provided important information on Se metabolism. However, selenium isotopes are expensive and difficult to obtain. A simple and cheap strategy based on the production of ^{77}Se -methylselenocysteine ($\text{Me}^{77}\text{SeCys}$) when preparing sauerkraut in presence of ^{77}Se -selenite was developed. The resulting $\text{Me}^{77}\text{SeCys}$ was used for evaluating the metabolic pathway of MeSeCys in Wistar rats by feeding them with an AIN-93M diet containing 20 % of sauerkraut enriched in $\text{Me}^{77}\text{SeCys}$. Organs (liver, kidney, brain, testicles and heart) were obtained after 7 days of treatment and subjected to total selenium and selenium speciation analysis by HPLC-ID-ICP-MS. Analysis of ^{77}Se labeled organs shown a prominent increase (more than a 100% of Se level enhancement) of selenium in kidney and heart, whereas in liver, selenium concentration only increased up to 20 %, remaining constant in brain and testicles. ^{77}Se -enriched sauerkraut supplementation does not alter the concentration of other essential elements in comparison to the controls, except in the case of heart and kidney, in which selenium was positively correlated with Mg, Zn, Cu and Mo. HPLC-ICP-MS analysis of hydrolyzed extracts after carbamidomethylation of the ^{77}Se labeled organs shows the presence of $^{77}\text{SeCys}$ and an unknown Se-containing peak, the identity of which could not be verified by ESI/MS/MS. Low amounts of $\text{Me}^{77}\text{SeCys}$ were found in ^{77}Se -labeled liver and kidney extracts, suggesting the incorporation of this selenium species in its intact form.

Keywords

^{77}Se -methylselenocysteine synthesis, sauerkraut, ^{77}Se -methylselenocysteine labeling, metabolisms, IDA-ICP-MS

Introduction

Selenium (Se) is an essential element to humans and plays an important role in a number of biological processes involving: immune and reproductive systems, thyroid function [1] and redox balance [2-5]. Therefore, improving Se status may benefit long-term health while strengthening the immune response. The dietary considerations of Se have led to a widespread scientific interest regarding the development of Se-enriched food products [6-10]. However, selenium metabolism, once ingested, has not been clearly stated. Selenium is commonly transformed into selenide which is assumed to be the intermediate for either the excretion or for the synthesis of proteins, where selenium is present as selenocysteine (SeCys), in selenoproteins, or as selenomethionine (SeMet) in selenium-containing proteins [11]. On the other hand, methylselenol is another intermediate compound involved in selenium metabolic pathway. This species is supposed to be the responsible for the anticarcinogenic effect of selenium [12], and it is obtained from methylselenocysteine (MeSeCys) through β -lyase reaction. A comprehensive understanding of selenium species metabolism is necessary in order to elucidate its physiological role. In this line, the use of isotopic labeled selenium is an easy way to monitor selenium metabolisms once ingested. Enriched stable isotopes are used to safely estimate the absorption and retention, or to study the uptake and metabolism of minerals in human physiological studies. As selenium is mainly covalently bound in selenoamino acids, the need for intrinsic labeling utilizing the natural biosynthetic pathways in living organisms is evident. However, the production of selenium isotopes is expensive and difficult to obtain. In a previous work [8], MeSeCys has been reported as the main metabolic product when preparing fermented cabbage (sauerkraut) in presence of Se(IV). Based on this work, a simple and cheap method was used for producing Me⁷⁷SeCys when preparing sauerkraut in presence of

⁷⁷Selenite. Moreover, metabolism of MeSeCys was evaluated by feeding rats with a diet containing Me⁷⁷SeCys-enriched sauerkraut. For this purpose, the resulting ⁷⁷Se-labeled metabolites were analyzed in different organs (kidney, liver, heart, brain, and testicles) by HPLC-ICP-MS and quantified by HPLC-ID-ICP-MS. The obtained results could help to provide further insights on the mechanism of action of MeSeCys. Further, the work illustrates how natural processes (such as lactic fermentation), which imply inorganic selenium biotransformation, can be useful for preparing selenium stable isotopes as tracers to investigate selenium metabolism and also to achieve rapid speciation analyses and quantification of Se by HPLC-ICP-MS.

Materials and methods

Instrumentation

An analytical microwave oven (CEM, Matthews, USA) was used for the acid digestion process.

Enzymatic hydrolysis of samples was carried out by using an Optic Ivymen System constant temperature incubator shaker (Comecta S.A., Spain). The extracts from the enzymatic hydrolysis were centrifuged in an Eppendorf centrifuge 5804 R F34-6-38 (Germany).

An Agilent HP-7700 Series ICP-MS (USA) equipped with an octapole reaction cell was used for monitoring ⁷⁷Se, ⁷⁸Se and ⁸⁰Se isotopes. Argon-based polyatomic interferences were reduced by using H₂ as the cell gas. For chromatographic experiments, a high-pressure pump Jasco PU-2089 (Italy) was used as the sample delivery system under isocratic conditions. The pump was fitted with a six-port Rheodyne 7725i sample injection (Rohner Park, USA). The separation was performed on an anionic exchange

PRP-X100 (250 x 4.1 mm, 10 μ m) (Hamilton, Switzerland), and a reversed-phase ion pairing C8 Zorbax R_x-C₈ (250 x 3.0 mm, 5 μ m) (Agilent, USA). The operating conditions for ICP-MS measurements as well as the chromatographic parameters are summarized in Table 1.

With the purpose of verifying the tentatively identified selenium species, ESI-MS/MS analysis were conducted by using a 6520 Q-TOF mass spectrometer (Agilent, USA) tandem quadrupole mass spectrometer in the selected positive-ion mode and by employing chromatographic conditions that were compatible with ESI-MS/MS

Reagents and standards

All chemicals and reagents used were of analytical grade and solutions were prepared with de-ionized water (18 M Ω cm) obtained from a Milli-Q water purification system unit (Millipore, USA). Stock standard solutions of SeMet, SeMeSeCys and SeCys₂ (Sigma-Aldrich, Germany) were prepared by dissolving them in 3% hydrochloric acid (37%, Merck, Germany). Inorganic selenium solutions were obtained by dissolving sodium selenite (Na₂SeO₃) and selenate (Na₂SeO₄), purchased from Merck, in 2% HNO₃ (60%, Sharlau, Spain).

⁷⁷Se-enriched standard (purity 99.66%) (Cambridge Isotope Laboratories, USA) was dissolved in a minimum volume of sub-boiled HCl and diluted with Milli-Q water. The concentration of ⁷⁷Se-enriched standard was determined by reverse IDA-ICP-MS.

For the enzymatic extraction, Tris-HCl buffer (pH 7.5) (Fluka; Germany), the nonspecific protease *Streptomyces griseus* (protease XIV) and *Candida rugose* (Lipase) (Sigma-Aldrich, Germany) were used

Carbamidomethylation (CAM) of samples was performed by using urea (99.5 %, Sigma-Aldrich, Germany), dithiothreitol (DTT) (99 %, Sigma-Aldrich, Germany) and iodoacetamide (IAM) (Sigma-Aldrich, Germany).

Selenium species separation by anionic-exchange chromatography was achieved by using 10 mM citric acid (Sigma) in 2% MeOH (99.9%, Scharlau, Spain) adjusted to pH 5 with ammonium hydroxide (Fluka, Germany) as mobile phase. The mobile phase for Zorbax C8 reversed-phase chromatography was 0.1% trifluoroacetic acid, (TFA) (Sigma-Aldrich, Germany) in 2% MeOH.

Fresh cabbages were provided by Bejo Iberica S. L. (Madrid, Spain) and fermented immediately upon reception.

Preparation of ^{77}Se -enriched sauerkraut. Synthesis of $\text{Me}^{77}\text{SeCys}$

White cabbages (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* cv. Megaton) grown in the North region of Spain (La Rioja) during winter season of 2008 were selected among five Spanish cultivars, based on their glucobrassicin content [13].

The cabbage heads were prepared by removing the outer leaves and their central core, as described in a previous work [8]. The edible part of cabbages was then shredded into about 2 mm thick strips using a shredder (Moka Express, Spain). Subsequently, 0.5% NaCl and 0.5 mg of sodium $^{77}\text{selenite}$ per kg of fresh cabbage (6.38 mg Se/kg of dry matter) were added. Shredded cabbage and brine were mixed thoroughly, transferred to sterile polyethylene vessels (8L) and tightly pressed to exclude air. Fermentations were performed spontaneously by the indigenous microbiota present on raw cabbage. Sauerkrauts, without addition of Se, were also prepared and considered as controls. Fermentations were carried out in 3 batches (4 kg per batch) at room temperature (22–25° C) for 7 days. On the third day, cabbage was pricked to remove releasing gases.

After fermentation, samples were freeze-dried, milled and stored at -20°C under vacuum until their characterization and subsequent administration to animals.

Animal experiments

Thirty male Wistar rats with an average initial body weight of 156 ± 2 g were distributed in three experimental groups ($n = 10$). The experiments lasted for 10 days, 3 days of adaptation and 7 days of the experimental period during which animals were housed in individual stainless-steel metabolic cages designed for food intake control. The cages were located in a well-ventilated thermostatically controlled room ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$), with relative humidity ranging from 40 to 60 % and 12h light/dark cycle. Food intake was controlled daily in all experimental groups and the animals consumed the different experimental diets *ad libitum*. At the end of the experimental period, rats were fasted for 12 h prior to be sacrificed by CO_2 inhalation. Liver, kidney, heart, brain, and testicles were extracted, weighed, and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . All experiments were undertaken according to Directional Guides Related to Animal Housing and Care [14] and all procedures were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Granada.

Rats were fed with an AIN-93M diet containing 20 % of freeze-dried ^{77}Se -enriched sauerkraut. AIN-93M diets were formulated following the recommendations of the American Institute of Nutrition [15], to meet the nutrient recommendations of adult rats [16], with casein supplemented with 0.5 % methionine as the sole source of protein (12 %). Addition of a 20 % as freeze-dried cabbage was selected as the expense of cellulose and wheat starch with the aim of establishing a reasonable content of cabbage in the diet that could resemble that of a general population. A control group fed with AIN-93M

diet containing a 20 % of freeze-dried non Se-enriched sauerkraut was also used in this study.

Total selenium and essential elements determination in rat organs after feeding with a diet containing $\text{Me}^{77}\text{SeCys}$ - enriched sauerkraut

Selenium and essential elements concentration was determined in rat organs (kidney, liver, heart, brain, testicles). Approximately 0.10 g of freeze-dried sample was digested with 1.00 mL of concentrated nitric acid and 0.30 mL of 30% hydrogen peroxide in an analytical microwave oven at 130 °C for 15 min with a ramp temperature of 10 min following conditions described previously [17]. The resulting solutions were diluted to 10.00 mL with deionized water. The concentration of essential elements was measured by ICP-MS by using the external calibration method and following the experimental conditions given in Table 1. Selenium concentration was determined by conventional and reverse mode of IDA-ICP-MS in control and intrinsically ^{77}Se labeled rat organs, respectively. For that purpose, an appropriate amount of ^{77}Se spike solution was added to samples just before applying the acid digestion step (a selenium solution of natural abundance was added when analyzing intrinsically ^{77}Se labeled samples by reverse IDA-ICP-MS analysis).

For IDA-ICP-MS analysis, isotope intensities were corrected with a detector dead time of 30 ns. Interferences caused by SeH^+ were corrected with a selenium factor (f_{Se}) ranged from 2.2-2.4 % of the Se signal, similar values to those reported before [18, 19]. Mass bias discrimination was computed every 5 analyses and a mass bias factor (K) of *ca.* - 4% per mass unit, in agreement with other authors [19, 20], was used to correct

$^{78}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ and $^{80}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ isotope ratio. Concentration of selenium was calculated by using the IDA equation described by García-Alonso *et al.* [21].

Selenium speciation in the intrinsically ^{77}Se labeled organs

A conventional enzymatic hydrolysis [22] consisting in incubation of 0.1 g of sample in 3 mL of 30 mM Tris-HCl (pH 7.5) with 30 mg of Protease XIV and 20 mg of Lipase at 37 °C for 20 h was performed. To improve the efficiency of SeCys extraction and to preserve the integrity of such species, samples were carbamidomethylated before applying enzymatic hydrolysis, based on the procedure reported by other authors [22, 23]. Briefly, 0.1 g of freeze-dried sample was incubated with 2 mL of 7 M urea in 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) and sonicated for 10 min in an ultrasound bath for protein denaturation. The solution was shaken and incubated at 25 °C in the dark with 30 µL of 0.2 M DTT in 0.1 M Tris-HCl and 40 µL of 0.5 M IAM for 1 h each step in order to reduce Se-Se, S-Se and S-S bonds and to protect them by methylation. To remove the excess of IAM, 375 µL of DTT was added and shaken for 1 h. The resulting solution was diluted with 0.1 M Tris-HCl until a final concentration of 1 M urea was reached. Finally, enzymatic hydrolysis was performed by 20 h of incubation at 37 °C using a protease/lipase solution mixture. The extracts were centrifuged at 10,233 g for 20 min and the supernatants were filtered through 0.22 µm Nylon filter and analyzed by anionic exchange and reversed-phase ion pairing C8 columns coupled to the ICPMS. Identification of selenium compounds was carried out by matching retention times and by spiking experiments. Recovery values were calculated as the sum of selenium in separated selenium compounds relative to the total selenium concentration obtained after performing microwave acid digestion. Selenium species quantification in organs

from control rats was performed by HPLC species-unspecific IDA-ICP-MS which allow us the quantification of both identified and unidentified species. For that purpose, a ^{77}Se -enriched standard solution of the appropriate known concentration was continuously mixed (at 0.1 mL min^{-1}) with the effluent of the column (at 0.9 mL min^{-1}) through a T piece and directly nebulized into the plasma. Conventional intensity chromatograms (counts s^{-1}) were converted into mass flow chromatograms (ng min^{-1}) after applying an adequate mathematical treatments based on the on-line isotope dilution equation [21]. The same corrections as in conventional IDA-ICP-MS used for total Se determination were applied to $^{78}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ and $^{80}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ isotope ratios before using the on-line isotope dilution equation to obtain the mass flow chromatograms. The amount of selenium corresponding to each chromatographic peak was achieved by area integration. ^{77}Se -labeled metabolites in the intrinsically ^{77}Se labeled organs were quantified by unspecific IDA-ICP-MS was carried out following the same procedure as above but replacing ^{77}Se spike solution by a selenium solution of natural abundance.

With the aim of identifying unknown selenium species, purification and isolation of the corresponding chromatographic peak was carried out by anion exchange and reversed-phase chromatography, respectively. Fractions collected were pooled, lyophilized and re-dissolved in water/methanol (1:1) prior to ESI MS/MS analysis. The ion-spray voltage was set at 4.5 KV and the fragmentor voltage at 150 V. Nitrogen was used as nebulizer, drying and collision gas. Samples were analyzed by using reversed-phase C18 chromatography coupled to ESI/MS/MS at a flow of 0.2 mL min^{-1} .

Results and discussion

Characterization of AIN-93M animal diet and ^{77}Se enriched sauerkraut

Prior to administering the diet to the experimental animals, both sauerkraut and AIN-93M diet were characterized in terms of total selenium content and occurrence of selenium species. The concentration of selenium in non enriched and ^{77}Se -enriched sauerkraut was 0.07 ± 0.01 and $5.21 \pm 0.03 \mu\text{g g}^{-1}$, respectively. The diet used to feed animals (AIN-93M with 20 % sauerkraut) provides selenium concentration values of 0.10 ± 0.04 and $1.21 \pm 0.04 \mu\text{g g}^{-1}$ when non-enriched and ^{77}Se enriched sauerkraut is employed, respectively. Regarding Se-species, selenium mainly appeared as Se(IV) and SeMet (Fig 1a) in the AIN-93M diet, whereas $\text{Me}^{77}\text{SeCys}$ was the major Se-species found in ^{77}Se -enriched sauerkraut (Fig. 1b). Selenium compounds were not detected in control sauerkraut. The results indicate that ^{77}Se enriched sauerkraut preparation is an easy and cheap alternative to obtain $\text{Me}^{77}\text{SeCys}$. Synthesis of $\text{Me}^{77}\text{SeCys}$ implies harsh chemical conditions and long-time procedures [24] which are not affordable for most laboratories working on speciation. Once $\text{Me}^{77}\text{SeCys}$ -enriched sauerkraut was prepared, it was employed to evaluate MeSeCys metabolism in Wistar rats fed with a diet containing 20% of ^{77}Se -enriched sauerkraut.

Selenium accumulation in rat organs after feeding them with a diet containing 20% of ^{77}Se -enriched sauerkraut. Effect on essential elements distribution.

Total selenium content in different organs (liver, kidney, heart, testicles and brain) from rats fed with a diet containing 20% of ^{77}Se -enriched or non-enriched sauerkraut (control group) was determined by IDA-ICP-MS after performing acid digestion. The results represented in Table 2 show that liver, testicles and kidney were the organs of the control group of rats with the highest selenium content, with selenium values of 3.7 ± 0.2 , 3.4 ± 0.3 and $1.9 \pm 0.2 \mu\text{g g}^{-1}$, respectively. This could be due to the fact that liver

and kidney are considered to be selenium -accumulating organs [25] and, by the other hand, selenium is required for sperm synthesis in testicles [26]. Analysis of ^{77}Se labeled organs shown a prominent increase (more than a 100% of Se level enhancement) of selenium in kidney and heart, whereas in liver, selenium concentration only increased up to 20 %, remaining constant in brain and testicles. Interestingly, although liver is the organ with the highest Se level in the control group, it did not experiment an important increase when rats were fed with a 20% of ^{77}Se -enriched sauerkraut diet. The data obtained evidence the selenium tendency to be accumulated in certain organs. Selenium accumulation in kidney could be explained as a part of a detoxification process prior to be excreted. The reason by which selenium level in heart is increased remains unclear but since this organ is quite sensitive to selenium status changes in the body [27], it could be more affected by the supplementation of selenium. In contrast, the selenium level remains constant in organs of important biological activity, such as brain or reproductive system in order to protect the body against selenium status modifications [28].

To ensure appropriate growth of experimental animals, they not only have to tolerate selenium, but supplementation with selenium should not alter the uptake and distribution of other essential elements (Cu, Mo, Mg, and Zn) or their biological functions. For this purpose, the concentration of several essential elements in the intrinsically ^{77}Se labeled rat organs were measured (Table 2). In general, selenium supplementation with a diet containing 20% of ^{77}Se -enriched sauerkraut does not alter the concentration of these elements in comparison to the controls, except in the case of heart and kidney. It is interesting to highlight that these two organs were those with the highest selenium increase after feeding rats with $\text{Me}^{77}\text{SeCys}$. To date, the number of studies on the influence of selenium supplementation and others metals on accumulation

and distribution of micronutrients in organs and tissues are scarce and the existing ones are sometimes controversial. Pedrero *et al.* [23] determined selenium and essential elements in organs of catfish fed with a selenium-enriched garlic-based diet (mainly as γ -glutamilmethylselenocysteine). Selenium supplementation did not have any effect on Zn and Cu accumulation and distribution in catfish organs. Cabañero *et al.* [29] evaluated Se-Hg interaction in chicken after supplementing them with selenium as selenite. Results showed that the concentration of Cu, Zn and Fe in kidney remains unaltered after long-term selenium exposure. In contrast, in other study [30] performed with broiler chickens supplemented with selenized yeast, selenium was positively correlated with Fe, Zn and Cu and negatively correlated with Cd. Based on the mentioned results, it is clear that trace elements may interact at the levels of absorption, distribution and retention. Deficiency or supplementation of one of them may alter their balance and trigger the antagonistic or synergistic effects. The alteration of trace elements balance may also affect the antioxidant system, since several trace elements such as Se, Cu, Zn and Fe are integrant of various antioxidant enzymes. The influence of selenium on trace metal distribution depends on the level and the chemical form of supplemented selenium, the animal and the type of the examined tissue.

Se speciation in the intrinsically ^{77}Se labeled and control rat organs

In the present work, the distribution of selenium species in the different organs was evaluated by HPLC-IDA-ICP-MS after species extraction by using carbamidomethylation process followed by enzymatic hydrolysis. Because of selenocysteine degradation, it is necessary to use a sample treatment procedure based on reduction with dithiotreitol (DTT) followed by acetylation with iodoacetamide(IAM) to

prevent oxidation of selenocysteine [22]. Therefore, commercially available Se-standards and samples were carbamidomethylated following the procedure described at Material and Methods Section. Two different chromatographic columns (anionic exchange and reversed-phase chromatography) coupled to ICPMS were used for analyzing the extracts of the different organs.

The anion exchange HPLC-ICP-MS chromatogram in Fig. 2a shows that $^{77}\text{SeCys}$ and a ^{77}Se -containing peak observed at 6 minutes were detected in the hydrolyzed extract of ^{77}Se labeled rat liver by using carbamidomethylation and enzymatic hydrolysis. In addition, the Se-containing peak found at 6 minutes matched the retention time with CAM-Se(IV) standard (Fig. 2a and 2d). However, when sample treatment was performed without applying a previous carbamidomethylation step, only SeCys was detected in liver extracts (Fig 2b), suggesting that the Se-containing peak observed at 6 minutes might be a Se-unknown peak originated when carbamidomethylation is applied prior enzymatic hydrolysis.

The anionic exchange HPLC-ICP-MS chromatographic profiles in Figure 3 show the distribution of the two selenium isotopes ^{78}Se and ^{77}Se in control and ^{77}Se -labeled organs. As it was previously mentioned, $^{78}\text{SeMet}$ and $^{78}\text{Se(IV)}$ were the main Se-species found in control diet, whereas $\text{Me}^{77}\text{SeCys}$ was the main Se-specie found in ^{77}Se -enriched sauerkraut diet. Selenocysteine was detected in all ^{77}Se -labeled organs and control organs. Low amounts of $\text{Me}^{77}\text{SeCys}$ in ^{77}Se -labeled liver and kidney extracts were found, suggesting the incorporation of this selenium compound in its intact form. The detection of low amounts of MeSeCys in liver and kidney in its intact form after feeding animals with such species has been reported by other authors [31, 32]. Suzuki *et al.* [31] evaluated the metabolisms of $^{77}\text{SeMet}$ and $\text{Me}^{76}\text{SeCys}$ orally administrated in

Wistar rats. The results indicated that MeSeCys was incorporated into selenoprotein P (SeP) slightly more than or at a comparable level to that of SeMet. SeMet and MeSeCys are suggested to be transformed into selenide through the β -lyase reaction but differently: SeMet is transformed into SeCys through the trans-selenation reaction, and then into selenide through the β -lyase reaction for SeCys. MeSeCys is transformed into methylselenol through the β -lyase reaction for MeSeCys, and then through the demethylation reaction into selenide. The results obtained in the present work are in agreement with those reported by Suzuki *et al.*[31], since the presence of SeCys, released from selenoproteins, in these metabolically active glandular visceral tissues (heart, kidney, liver, brain and) can be explained as a result of the conversion of the species initially present in the supplemented diet..

Since species identification using a unique chromatography column should not be used as conclusive, a reversed-phase separation mechanism was also employed. The chromatograms obtained corresponding to the hydrolyzed extracts of ^{77}Se -labeled organs are shown in Figure 4 and clearly demonstrate the presence of SeCys and an unknown Se-containing peak.

The origin of the unknown Se-containing peak is not clear but it could be formed by any of the three species administrated to the animals since selenium was present as ^{77}Se (from Me $^{77}\text{SeCys}$) and as ^{78}Se (from $^{78}\text{SeMet}$ or $^{78}\text{Selenite}$). The metabolism pathway of SeMet and MeSeCys involves the production of Se intermediates such as methylselenol, selenide or methylseleninicacid [31, 33] before the production of selenoproteins, or the formation of selenosugars and trimethylselenonium (TMSe) as urinary metabolites [33]. In the present work, TMSe was not observed in liver or kidney.. The unknown Se-

containing peak was also detected in heart and brain suggesting that it is not a Se-urinary metabolite. As the Se-unknown peak was only detected when carbamidomethylation was applied, its presence could be also attributed to artifacts formation during carbamidomethylation. With the aim of identifying the unknown peak found in carbamidomethylated tissues, ESI MS/MS was unsuccessfully applied. Further, the coupling of C18 reversed-phase LC to ESI MS/MS in order to suppress possible interferences from the matrix which can affect the ionization also failed. The low amount of selenium in the tested organs made difficult to identify the unknown Se-containing peak.

Since the identification of one of the Se-species was not possible, quantification of species was carried out by species-unspecific IDA-ICP-MS by continuously mixing an enriched ^{77}Se solution (selenium solution of natural abundance in the case of reverse IDA) with the effluent of the column. By using this mode of IDA both identified and unidentified species can be quantified. Figure 5 shows the mass flow chromatograms of control and Se-enriched liver extracts obtained by anionic exchange IDA-ICP-MS. Table 3 shows the total content of selenium, recovery values (calculated as the amount of selenium extracted relative to the total selenium concentration obtained after acid digestion), the concentration of Se-species and the fraction of total selenium (calculated as the sum of selenium in separated Se species relative to the total Se extracted) from both control and ^{77}Se labeled rat organs. Recovery values ranged from 52 to 100%, being the liver the organ which provides a minimum selenium extraction yield.

In general, control samples presented a higher content of CAM-SeCys and a lower content of the unknown species than ^{77}Se -labeled organs. Formation of the unknown Se-containing peak seems to be favored by presence of MeSeCys. The organs with higher content of either SeCys or the unidentified species were liver, kidney and testicles and,

after supplementation, testicles diminished the content of both species while heart increased concentration of the unknown Se-containing peak.

Conclusions

Preparation of sauerkraut in the presence of selenite represents a cheap and easy way for obtaining Me⁷⁷SeCys as tracer in either quantitative speciation or metabolism studies. The method could be considered as an alternative to commonly practices of preparing labeled MeSeCys which imply the application of harsh chemical conditions. Supplementation with an AIN-93M diet containing 20 % of Me⁷⁷SeCys-enriched sauerkraut to Wistar rats showed the presence of ⁷⁷SeCys and unknown Se-containing peak in all ⁷⁷Se labeled rat organs. Moreover, IDA-ICP-MS analysis of ⁷⁷Se labeled organs showed a prominent increase (more than a 100% of Se level enhancement) of selenium in kidney and heart. ⁷⁷Se-enriched sauerkraut supplementation does not alter the concentration of other essential elements in comparison to the controls, except in the case of heart and kidney, in which selenium was positively correlated with Mg, Zn, Cu and Mo. We have also demonstrated how natural processes (such as lactic acid fermentation) that imply inorganic selenium biotransformation can be useful to prepare selenium stable isotopes as tracers to investigate selenium metabolism and also to achieve rapid speciation analyses and quantification of Se by HPLC-ICP-MS.

Acknowledgments

The Complutense University Group of Trace and Speciation Analysis thanks the Spanish Commission of Science and Technology (CTQ2011-22732), the Community of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Madrid, Spain, and the European Community for funding the FEDER programme (S2010/AGR-1464, ANALYSIC II). María Sánchez-Martínez would also like to thank the Spanish Government for a doctoral fellowship (CTQ2008-05925). This research was also funded by project AGL2007-62044 from the Spanish Ministry of Education and Science.

For Peer Review

References

1. Rayman MP (2002) The argument for increasing selenium intake. *P Nutr Soc* 61: 203-215.
2. Clark LC, Graham GF, Gross EG, Krongrad A, Leshner JL Jr, Park HK, Sanders BB Jr, Smith CL, Taylor JR (1996) The nutritional prevention of cancer with selenium 1983-1993: a randomized clinical trial. *J Am Med Assoc* 276: 1957-1963.
3. Ip C (1998) Lessons for basic research in selenium and cancer prevention. *J Nutr* 128: 1845-1854.
4. Abdulah R, Miyazaki K, Nakazawa M, Koyama H (2005) Chemical forms of selenium for cancer prevention. *J Trace Elem Med Bio* 19: 141-150.
5. Jackson MI, Combs GF Jr (2008) Selenium and anticarcinogenesis: underlying mechanisms. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11: 718-726.
6. Pedrero Z, Madrid Y, Cámara C (2006) Selenium species bioaccessibility in enriched radish (*Raphanus sativus*): A potential dietary source of selenium. *J Agr Food Chem* 54: 2412-2417.
7. Alzate A, Cañas B, Pérez-Mungía S, Hernández H, Pérez-Conde C, Gutiérrez AM, Cámara C (2008) Evaluation of the inorganic selenium biotransformation in Se-enriched yogurt by HPLC-ICP-MS. *J Anal Food Chem* 56: 8728-8736.
8. Peñas E, Martínez-Villaluenga C, Frías J, Sánchez-Martínez MJ, Pérez-Corona MT, Madrid Y, Cámara C, Vidal Valverde C (2012) Se improves indole glucosinolate hydrolysis products content, Se-methylselenocysteine content, antioxidant capacity and potential anti-inflammatory properties of sauerkraut. *Food Chem* 132: 907-914.

9. Alzate A, Pérez-Conde C, Gutiérrez AM, Cámara C (2010) Selenium-enriched fermented milk: A suitable dairy product to improve the selenium intake for humans. *Int Dairy J* 20: 761-769.
10. Sánchez-Martínez M, Galvao, P. da Silva E, Pérez-Corona T, Cámara, Ferreira SLC, Madrid Y (2012) Selenite biotransformation during brewing. Evaluation by HPLC-ICP-MS. *Talanta* 88: 272-276.
11. Szpunnar J (2005) Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomicc. *Analyst* 130: 442-465.
12. Ip C, Dong Y, Ganther HE (2002) New concepts in selenium chemoprevention. *Cancer metast Rev* 21: 281-289.
13. Peñas E, Frías J, Martínez-Villaluenga C, Vidal Valverde C (2011) Bioactive compounds, myrosinase activity and antioxidant capacity of White cabbages grown in different locations of Spain. *J Agr Food Chem* 59: 3772-3779.
14. European Union Council (2010) Directive 2010/63/UE on the Protection of Animals used for Scientific Purposes. Official Journal of the European Union, Strasbourg.
15. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC (1993) AIN-93G purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition *Ad Hoc* Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951.
16. National Research Council (1995) In: (ed) Nutrient Requirements of Laboratory Animals Fourth Revised Edition. National Academy Press, Washington D.C.

17. Cabañero AI, Madrid Y, Cámara C (2004) Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an in vitro digestion method. *Anal Chim Acta* 526: 51-61.
18. Pedrero A, Ruiz-Encinar J, Madrid Y, Cámara C (2007) Application of species-specific isotope dilution analysis to the correction for selenomethionine oxidation in Se-enriched yeast simple extracts during storage. *J Anal Atom Spectrom* 22: 1061-1066.
19. Hinojosa-Reyes L, Marchante-Gayón JM, García-Alonso JI, Sanz-Medel A (2003) Determination of selenium in biological materials by isotope dilution analysis with an octapole reaction system ICP-MS. *J Anal Atom Spectrom* 18: 11-16.
20. Kirby JK, Lyons GH, Karkkainen MP (2008) Selenium speciation and bioavailability in biofortified products using species-unspecific isotope dilution and reversed phase ion pairing-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J Agr Food Chem* 56: 1772-1779.
21. García-Alonso JI, Rodríguez P (2011) In: C. Cámara C, Pérez-Conde C (eds) *Análisis químico de trazas*, Editorial Síntesis S.A., Spain.
22. Bierla K, Dernovics M, Vacchina V, Szpunar J, Bertin G, Lobinski R (2008) Determination of selenocysteine and selenomethionine in edible animal tissues by 2D size-exclusion reversed-phase HPLC-ICP MS following carbamidomethylation and proteolytic extraction. *Anal Bioanal Chem* 390: 1789-1798.
23. Pedrero Z, Murillo S, Cámara C, Schram E, Luten JB, Feldmann I, Jakubowski N, Madrid Y (2011) Selenium speciation in different organs of African catfish (*Clarias gariepinus*) enriched through a selenium-enriched garlic based diet. *J Anal Atom Spectrom* 26: 116-125.

24. Otha Y, Suzuki N, Kobayashi Y, Hirano S (2011) Rapid speciation and quantification of selenium compounds by HPLC-ICP MS using multiple standards labelled with different isotopes. *Isot Environ Healt* 47: 330–340.
25. Ciardullo S, Aureli F, Coni E, Guandalini E, Iosi F, Raggi A, Rufo A, Cubadda F (2008) Bioaccumulation potential of dietary arsenic, cadmium, lead, mercury, and selenium in organs and tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a function of fish growth. *J Agr Food Chem* 56: 2442-2451.
26. D. Behne, H. Weiler, A. Kyriakopoulos, Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats, *J. Reprod. Fertil.* 106 (1996) 291-297.
27. Patching SG, Gardiner RHE (1999) Recent developments in selenium metabolism and chemical speciation: A review. *J Trace Elem Med Bio* 13: 193-214.
28. Behne D, Weiss-Nowak C, Kalcklösch M, Westphal C, Gessner H, Kyriakopoulos (1995) A Studies on the distribution and characteristics of new mammalian selenium-containing proteins *Analyst* 120: 823-825.
29. Cabañero AI, Madrid Y, Cámara C (2005) Study of mercury-selenium interaction in chicken liver by size exclusion chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal Atom Spectrom* 20: 847-855.
30. Pappas, AC Zoidis E, Georgiou CA, Demir N, Surai PF, Fegeros K (2011) Influence of organic selenium supplementation on the accumulation of toxic and essential elements involved in the antioxidant system of chicken. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 28: 446-454.

- 1
2
3 31. Suzuki KT, Doi C, Suzuki N (2006) Metabolism of ^{76}Se -methylselenocystine
4 compared with that of ^{77}Se -selenomethionine and ^{82}Se -selenite. Toxicol Appl Pharm
5 217: 185-195.
6
7
8
9
10 32. Suzuki Y, Hashiura Y, Sakai T, Yamamoto T, Matsukawa T, Shinohara A, Furuta N
11 (2013) Selenium metabolism and excretion in mice after injection of ^{82}Se -enriched
12 selenomethionine. Metallomics 5: 445-452.
13
14
15 33. Suzuki KT, Somekawa L, Suzuki N, (2006) Distribution and reuse of ^{76}Se -
16 selenosugar in selenium-deficient rats. Toxicol Appl Pharm 216: 303-308.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure Captions

Fig. 1. Anion-exchange HPLC-ICP-MS of a hydrolyzed extract of a) control ($m/z = 78$) and b) ^{77}Se -enriched sauerkraut ($m/z = 77$) diets.

Fig. 2. Anion exchange HPLC-ICP-MS chromatograms of hydrolyzed extracts of ^{77}Se -labeled liver (monitoring on $m/z = 78$ and 77) obtained by a) enzymatic hydrolysis after carbamidomethylation, b) enzymatic hydrolysis without carbamidomethylation, and chromatograms of c) a mixture of Se-standards and d) a mixture of carbamidomethylated Se-standards.

Fig. 3. Anion exchange HPLC-ICP-MS chromatograms of hydrolyzed extracts corresponding to control (left panel) and ^{77}Se -labeled organs (right panel) a) kidney, b) heart, c) testicles and d) brain.

Fig. 4. Reversed-phase C8 column HPLC-ICP-MS chromatograms of hydrolyzed extracts corresponding to ^{77}Se -labeled organs a) kidney, b) heart, c) testicles and d) brain.

Fig. 5. Mass flow chromatograms by anion exchange-ID-ICP-MS of hydrolyzed extracts corresponding to: a) control liver (at $78/77$ isotope ratio measurement) and b) ^{77}Se labeled-liver (at $77/78$ isotope ratio measurement).

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

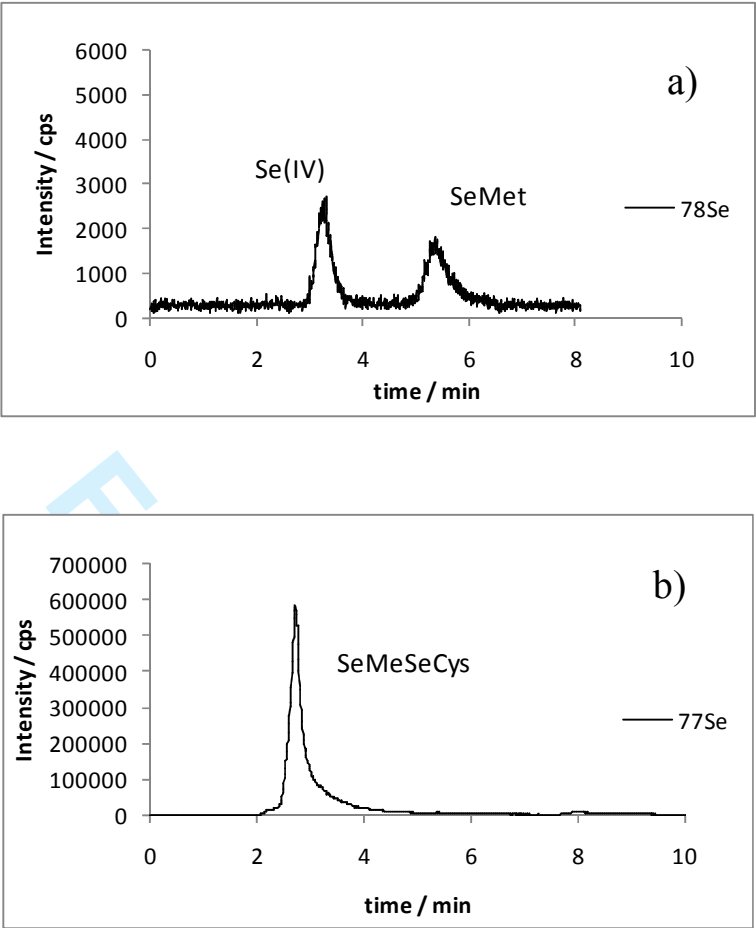


Fig 1

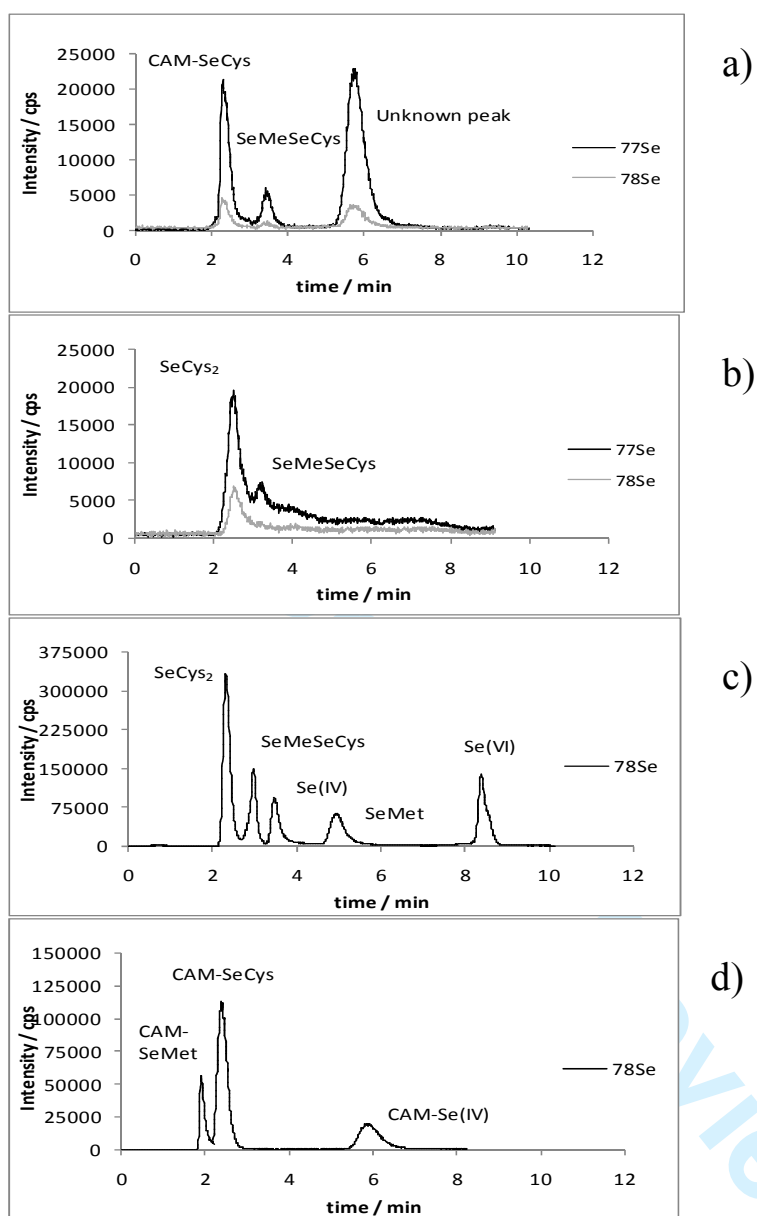


Fig. 2

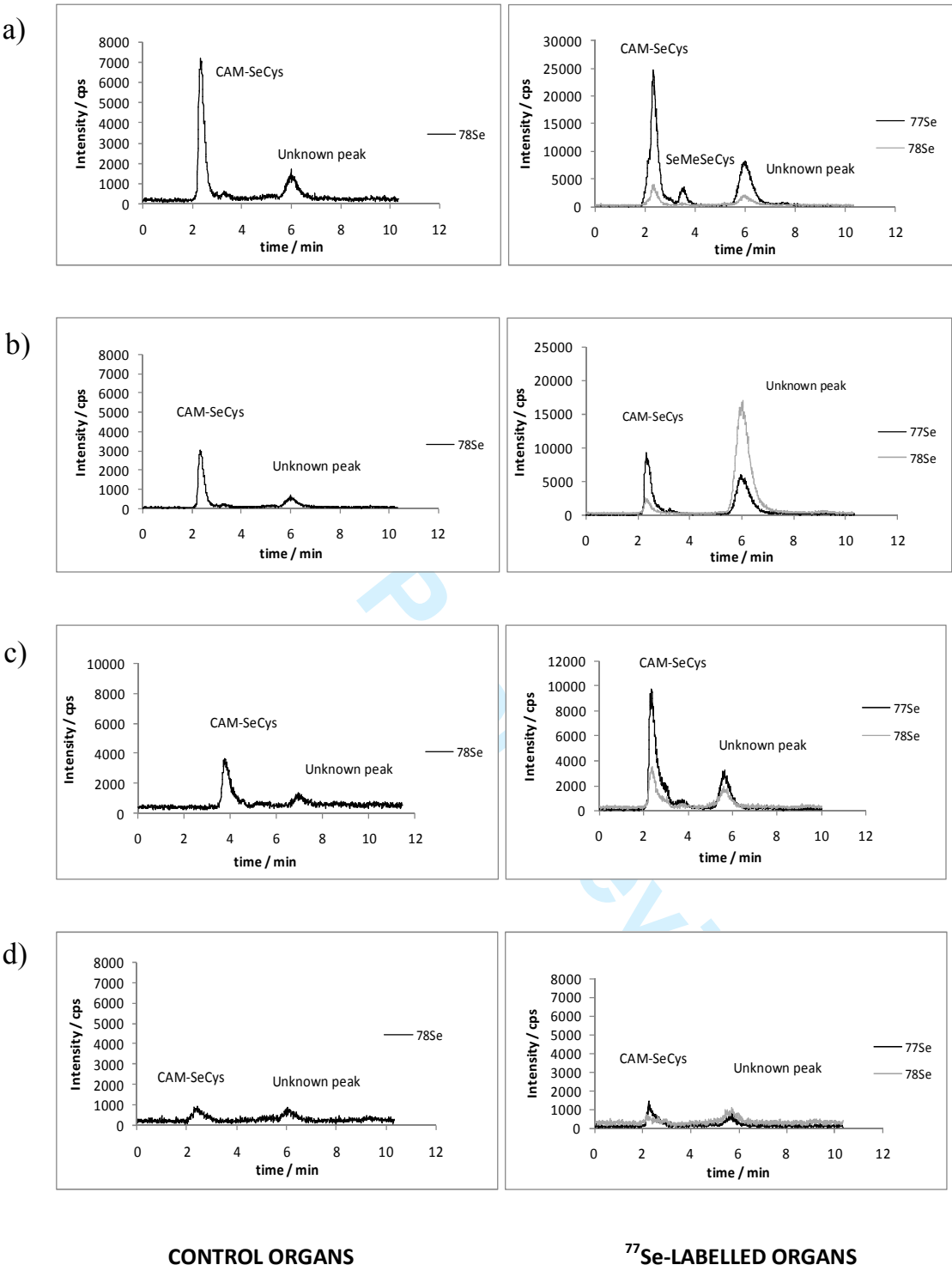


Fig 3

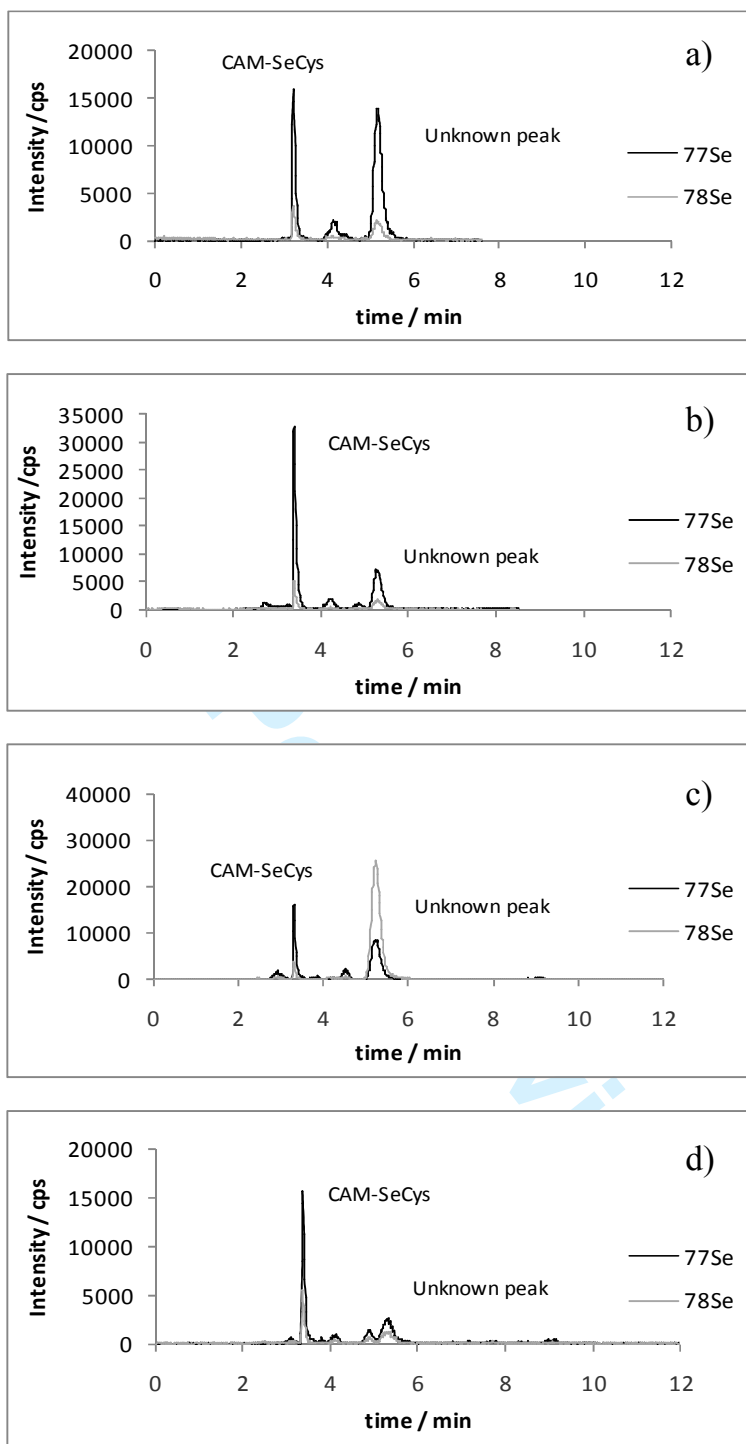


Fig. 4

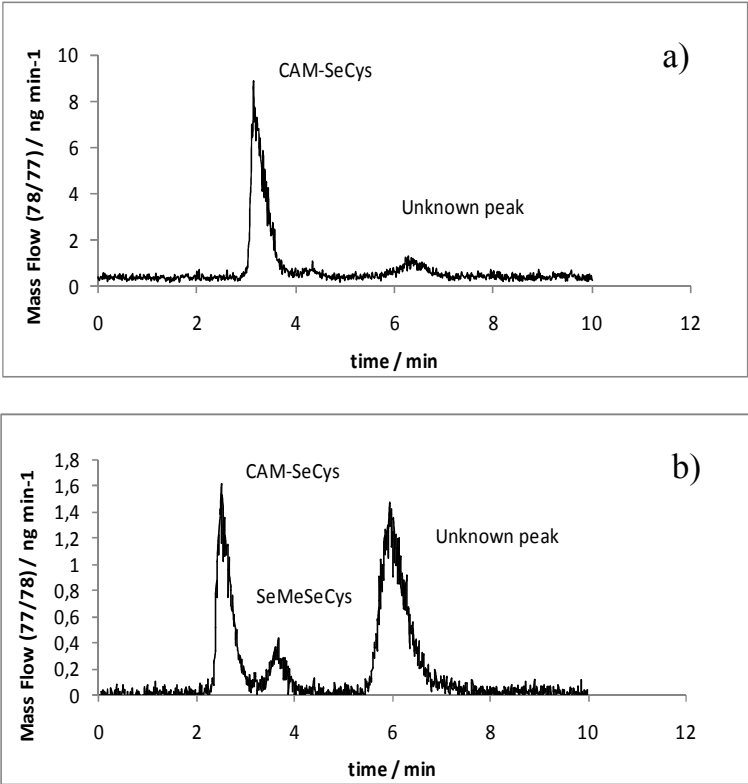


Fig. 5

Table 1. Instrumental operating conditions for determinations by HPLC-ICP-MS.

ICP-MS conditions			
Forward power		1550 W	
Plasma gas flow rate		15.0 L min ⁻¹	
Auxiliary gas flow rate		1.26 L min ⁻¹	
Carrier gas flow rate		1.1 L min ⁻¹	
H ₂ reaction gas flow rate		4.5 mL min ⁻¹	
Nebulizer type		Meinhard	
Spray chamber type		Scott-double pass	
Isotope monitored		⁷⁶ Se, ⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se, ⁸⁰ Se, ⁶³ Cu, ⁶⁵ Cu, ²⁴ Mg, ⁹⁵ Mo, ⁹⁸ Mo, ⁶⁴ Zn, ⁶⁶ Zn, ⁷⁹ Br, ⁸¹ Br	
LC parameters			
Analytical Column	Mobile phase	Flow Rate	Injection Volume
PRP X -100	10 mM Ammonium citrate, 2% MeOH, pH 5	1.0 mL min ⁻¹	100μL
Zorbax RP-C8	0.1% TFA, 2% MeOH, pH 1.98	1.0 mL min ⁻¹	100μL

Table 2. Concentration of selenium and essential elements ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry mass) in control and intrinsically ^{77}Se -labeled organs

	Selenium		Copper		Magnesium		Molibdenum		Zinc	
	Control	^{77}Se -labeled organs	Control	^{77}Se -labeled organs	Control	^{77}Se -labeled organs	Control	^{77}Se -labeled organs	Control	^{77}Se -labeled organs
Liver	3.7 ± 0.2	4.4 ± 0.3	12.4 ± 0.4	11.0 ± 0.5	834 ± 23	744 ± 29	1.68 ± 0.02	1.62 ± 0.06	109 ± 4	97 ± 2
Kidney	1.9 ± 0.2	4.1 ± 0.3	5.7 ± 0.1	16.2 ± 0.2	308 ± 4	544 ± 13	0.39 ± 0.02	1.1 ± 0.3	39 ± 1	98 ± 11
Heart	0.8 ± 0.1	1.70 ± 0.05	6.7 ± 0.1	18.2 ± 0.6	449 ± 6	792 ± 42	0.29 ± 0.02	0.84 ± 0.07	42 ± 1	108 ± 4
Testicles	3.4 ± 0.3	2.7 ± 0.1	7.4 ± 0.4	8.7 ± 0.5	1098 ± 59	1138 ± 4	0.26 ± 0.02	0.28 ± 0.03	140 ± 4	140 ± 4
Brain	0.46 ± 0.06	0.6 ± 0.1	7.2 ± 0.2	7.4 ± 0.1	577 ± 20	596 ± 10	0.16 ± 0.03	0.13 ± 0.02	54 ± 1	61 ± 4

All the concentrations are given as the mean \pm standard deviation. N= 3 replicates.
Total selenium concentration was determined by conventional and reverse mode of ID-ICP-MS in control and intrinsically ^{77}Se labeled rat organs, respectively.
Essential element concentration was determined by ICP-MS using external calibration method.

Table 3. Concentration ($\mu\text{g Se g}^{-1}$ dry mass) of selenium-species contained in control and intrinsically ^{77}Se -labeled organs.

	Total Se	Se extracted	Recovery (%)	CAM-SeCys	MeSeCys	Unknown species	Fraction of total selenium (%)
Control Liver	3.7 ± 0.2	2.01 ± 0.01	54 ± 3	1.09 ± 0.09	-	0.15 ± 0.01	62 ± 4
^{77}Se -labeled Liver	4.4 ± 0.3	2.29 ± 0.07	52 ± 1	0.42 ± 0.06	0.13 ± 0.02	0.63 ± 0.01	52 ± 3
Control Kidney	1.9 ± 0.2	1.89 ± 0.02	99 ± 4	1.02 ± 0.03	-	0.39 ± 0.01	74 ± 4
^{77}Se -labeled Kidney	4.1 ± 0.3	3.71 ± 0.01	91 ± 3	0.87 ± 0.02	0.39 ± 0.01	0.56 ± 0.02	51 ± 3
Control Heart	0.8 ± 0.1	0.78 ± 0.01	98 ± 4	0.43 ± 0.01	-	0.16 ± 0.01	76 ± 3
^{77}Se -labeled Heart	1.70 ± 0.05	1.63 ± 0.03	96 ± 3	0.26 ± 0.02	-	0.80 ± 0.03	65 ± 4
Control Testicles	3.4 ± 0.3	3.48 ± 0.04	102 ± 5	0.52 ± 0.01	-	0.33 ± 0.01	25 ± 1
^{77}Se -labeled Testicles	2.7 ± 0.1	2.73 ± 0.02	101 ± 2	0.33 ± 0.01	-	0.10 ± 0.01	16 ± 2
Control Brain	0.46 ± 0.06	0.45 ± 0.01	98 ± 1	0.10 ± 0.01	-	-	22 ± 1
^{77}Se -labeled Brain	0.6 ± 0.1	0.54 ± 0.02	90 ± 4	0.13 ± 0.01	-	0.08 ± 0.01	39 ± 1

Concentration of selenium species are given as mean \pm standard deviation ($n = 3$).

The fraction of total Se (%) denotes the ratio of the sum of Se species concentrations to total selenium extracted.

Se-species quantification was achieved by HPLC post column ID-ICP-MS by monitoring $^{78}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ and $^{77}\text{Se}/^{78}\text{Se}$ isotope ratios in control and ^{77}Se -labeled organs, respectively.

V. DISCUSIÓN INTEGRADORA

V. DISCUSIÓN INTEGRADORA

El trabajo de investigación desarrollado en esta memoria tiene una doble finalidad. Por un lado, estudiar la viabilidad de elaborar alimentos enriquecidos en selenio orgánico a partir de la acción de microorganismos, al mismo tiempo que se evalúa la biotransformación y bioacumulación del selenio en los mismos. Por otro lado, abordar el estudio del metabolismo del selenio en organismos vivos, utilizando para ello el marcaje isotópico, lo cual facilita el seguimiento de las especies marcadas. Para alcanzar estos objetivos, fue necesario desarrollar metodologías analíticas para extraer y cuantificar especies de selenio en diferentes matrices biológicas. A continuación se discuten globalmente los resultados obtenidos en los trabajos de la presente memoria.

Las enfermedades asociadas a la deficiencia de selenio así como los efectos beneficiosos relacionados con un nivel óptimo de este elemento en el plasma, hacen que una ingesta adecuada del mismo sea de gran importancia. El hecho de que el contenido de selenio en el suelo se halle ligado a su concentración en los alimentos, tanto de origen vegetal como animal, y que por lo tanto afecte al estatus de selenio en la población, genera que existan muchas zonas geográficas deficitarias en el consumo de este nutriente. Los alimentos funcionales enriquecidos en selenio constituyen una herramienta con un gran potencial para paliar estas carencias. El enriquecimiento de este tipo de alimentos se puede realizar antes de su procesamiento mediante procesos de biofortificación de materias primas, como puede ser el caso de los cereales en la fabricación del pan o cerveza, o de la uva en el caso del vino, o bien durante su elaboración, resultando ésta última una alternativa más sencilla y rápida. Dentro de esta estrategia, se encuentra la preparación de los alimentos fermentados, que se obtienen por la acción de determinados microorganismos. Algunos de estos microorganismos son capaces de acumular grandes cantidades de selenio y transformar sus formas inorgánicas en especies orgánicas nutricionalmente más seguras y bioactivas, como es el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* o de bacterias como la *Lactobacillus*, por lo que presentan un especial interés en el

estudio del **desarrollo de alimentos enriquecidos en selenio a través del proceso de fermentación**.

En cuanto a trabajos de especiación de selenio publicados, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida en selenio es la matriz más estudiada, ya que presenta una elevada concentración de selenio en forma de selenometionina (lo que facilita su identificación y cuantificación), un elevado valor nutricional, y ha demostrado importantes propiedades anticancerígenas en diferentes estudios, lo que hace que la caracterización de esta matriz sea de gran interés e importancia. Además, la levadura selenizada es fácil de obtener con bajo coste económico. Todo esto, unido al hecho de que es la levadura más utilizada en la elaboración de alimentos fermentados, convierte al género *Saccharomyces* en el perfecto candidato para la realización de estudios de biotransformación de selenio en alimentos fermentados, como son el vino, la cerveza y el pan.

Los trabajos realizados en la presente memoria con **bebidas fermentadas enriquecidas en selenio** se llevaron a cabo en **vino y cerveza**, los cuales utilizan mayoritariamente levaduras del género *Saccharomyces* para su fermentación. El vino blanco se elaboró a partir de mosto de uva blanca (denominación Barbadillo, Cádiz) desfogado y sin piel, al que se le adicionó la levadura y una disolución de selenito sódico de concentraciones de entre 1 a 20 µg Se/mL, dejándose fermentar durante 21 días a 17-20°C. En el caso del vino tinto, el mosto utilizado provenía de uva tinta (denominación Palomino, Cuenca) sin filtrar ni desfugar, y las condiciones de la fermentación alcohólica variaban a 19 días a 25-30°C, tras la cual el vino se separaba de la levadura, el hollejo y la piel, y se dejaba durante 15 días más a 17°C para realizar la fermentación maloláctica. Por otro lado, se elaboraron cervezas *Ale* y *Lager* filtradas, que se producen por fermentación de la levadura en la parte superior e inferior del líquido, respectivamente. Su elaboración consistió en adicionar agua al extracto de malta y a la levadura, además de la disolución de selenito sódico de concentraciones de selenio comprendidas entre 0.2 y 20 µg Se/mL, y dejarlo fermentar a 18°C durante 12 días. En el caso de la cerveza, la

posibilidad que ésta ofrece de consumirse turbia, sin separar la levadura de la bebida, presenta una ventaja a la hora de preservar y aprovechar el contenido de las especies orgánicas de selenio formadas por acción de la levadura, por lo que se elaboró también cerveza *Ale* sin filtrar.

Ciertos microorganismos son sensibles a variaciones en su entorno como son el pH, la temperatura, la fuente de carbono utilizada o la presencia de otros elementos. Por ello, también se evaluó el efecto del selenio sobre el crecimiento y capacidad de fermentación de la levadura. Para ello, se estudió la influencia de la adición de distintas concentraciones de selenio, de 1 a 10 $\mu\text{g Se/mL}$, en forma de selenito, en el crecimiento celular de la levadura tanto en medio de cultivo YEPD (*yeast extract peptone dextrose*, extracto de levadura de peptona y dextrosa), como en mosto, observándose que el crecimiento no se veía afectado en el intervalo de concentraciones de selenito ensayadas.

Tanto en el caso del vino como de la cerveza, el porcentaje de selenio presente en la bebida, que se obtuvo determinando el contenido de selenio en la muestra mediante ICP-MS previa digestión ácida de la muestra en un horno de microondas, se fue incrementando al hacerlo la cantidad de selenio inicialmente adicionada hasta llegar a un máximo del 60%, en el caso de la adición de 10 $\mu\text{g/mL}$ de selenio.

Para el estudio de la biotransformación del selenio tanto en la matriz vínica como en la cerveza, o en la levadura residual, se realizó un tratamiento de muestra mediante una hidrólisis enzimática con proteasa *Streptomyces griseus*, utilizando tanto la sonda de ultrasonidos como la incubación a temperatura controlada, y posteriormente se llevó a cabo la determinación de selenio en los extractos hidrolizados mediante LC-ICP-MS utilizando distintos mecanismos de separación. Los resultados obtenidos mostraron que ambas metodologías de extracción (sonda y baño de incubación) permitían obtener una extracción de especies cuantitativa además de que proporcionaban unos perfiles cromatográficos similares. Sin embargo, el empleo de la sonda de ultrasonidos permitió reducir considerablemente el tiempo de extracción de especies, puesto que

se realizaba la extracción del selenio en 2 minutos frente a los largos tiempos, entre 16 y 48 horas, requeridos por las incubaciones convencionales a temperatura controlada. Esto es posible debido a que la sonda de ultrasonidos acelera las reacciones químicas muestra-extractante y favorece la ruptura de la pared celular, facilitando el contacto entre la muestra y la enzima. El principal inconveniente que presenta la sonda de ultrasonidos es que puede generar radicales activos durante el proceso de cavitación que produzcan la degradación de las especies presentes. El hecho de que los perfiles cromatográficos fuesen similares con incubación y sonda de ultrasonidos, sugiere que con este último las especies presentes no se ven afectadas por la energía de ultrasonidos.

Generalmente, en los estudios de especiación la identificación de especies se lleva a cabo por comparación del tiempo de retención de patrones comerciales. Sin embargo, esto puede llevar a resultados erróneos puesto que se puede producir la coelución de especies en una columna, especialmente de las que eluyen cerca del volumen muerto de la columna, es decir, las poco retenidas en ella. Al utilizar más de un mecanismo de separación cromatográfico, se elimina esa problemática. Además de eso, la adición del patrón a la muestra permite corregir posibles desplazamientos producidos por efecto de la matriz. Para una identificación completamente inequívoca, el posterior uso de técnicas estructurales basadas en la espectrometría de masas molecular es imprescindible, aunque en muchos casos no es posible ya que no posee la sensibilidad suficiente para la caracterización de las bajas concentraciones de selenio presentes.

Mediante el empleo de dos columnas cromatográficas se pudo concluir que la principal especie presente en la levadura era la SeMet, la cual suponía un 95 % del selenio total presente en la misma, mientras que en el vino y la cerveza producidos, la especie mayoritaria era la SeMet oxidada, con pequeñas cantidades de SeMet que sólo representaba el 1% del selenio total incorporado a la bebida. Estos resultados se compararon con aquellos obtenidos empleando un tratamiento de muestra en ausencia de proteasa, poniéndose de manifiesto que la SeMet se encontraba principalmente unida a proteínas en la levadura residual, mientras que en el vino y

en la cerveza estaba presente en su forma libre. El análisis directo del vino tinto demostró que la oxidación de la SeMet no se produjo por la acción de la sonda de ultrasonidos sobre esta matriz, ya que los niveles de SeMet oxidada eran similares a los encontrados en el vino sometido a sonicación. En el caso de la cerveza turbia, sin filtrar, que contenía la fracción de levadura en su interior, la cantidad de SeMet oxidada en ella fue mínima, encontrándose en su mayoría como SeMet. La oxidación de la SeMet a SeMet oxidada se produce generalmente de forma no controlada, pudiendo tener lugar en la etapa de almacenamiento de la muestra y/o extracción de las especies de selenio. La formación de la SeMet oxidada supone un inconveniente a la hora de llevar a cabo la cuantificación de la SeMet ya que se pueden producir errores por defecto, especialmente si se utilizan los métodos habituales de calibración, es decir calibración externa.

Los resultados obtenidos en estos trabajos indican que la SeMet libre presente en el vino y la cerveza procede de la transferencia de la misma desde la levadura, que ya la contiene, durante el proceso de separación de las fases y, al encontrarse ésta en forma libre, su oxidación se produciría con mayor rapidez, lo cual ocurre presumiblemente durante el almacenamiento de las bebidas, pudiendo ser una justificación de la elevada cantidad de SeMet oxidada en comparación con la SeMet presente. Al eliminarse la etapa de separación de fases, como ocurre en la cerveza sin filtrar, no se libera tanta SeMet y como ésta permanece unida a las proteínas, se preserva la integridad de dicha especie en mayor medida.

Por otra parte, la evaluación de la influencia de la especie de *Saccharomyces* (*S. cerevisiae* y *S. bayanus* para el vino y *S. uvarum* y *S. cerevisiae* para la cerveza) utilizada, así como de su población (2 y 5 millones de células por mililitro) en el proceso de biotransformación del selenio, mostró que no existían diferencias entre las levaduras empleadas ni la población de las mismas. Las poblaciones ensayadas fueron elegidas basándonos en las condiciones en las que se elaboraban los vinos en la propia bodega, las cantidades habituales para la elaboración de cerveza, y las empleadas a escala de laboratorio.

Los estudios realizados con vino tinto mostraron que la fermentación maloláctica no producía ningún efecto en la transformación del selenio, corroborando que dicha transformación se produce por acción de la levadura durante la fermentación alcohólica. Además, puesto que no se conoce el efecto que la SeMet oxidada pudiera tener en la salud y ya que su formación supone un problema en la determinación cuantitativa de especies, es conveniente mantener la oxidación al mínimo nivel posible. Por este motivo, en los estudios con vino tinto se evaluó la capacidad de ciertos compuestos antioxidantes, normalmente presentes en procesos de vinificación, para conservar la integridad de la SeMet. Los compuestos reductores utilizados fueron, por un lado, los taninos, que se encuentran en el hollejo de la uva por lo que están presentes en grandes cantidades en el vino tinto, y por otro lado el sulfito, un aditivo que se utiliza al comienzo de la fermentación del vino con función antiséptica. Ninguno de estos compuestos pareció disminuir de manera significativa la oxidación de la SeMet. Sin embargo, el uso de cantidades en exceso de sulfito (por encima del límite máximo de 30 mg/L referido como SO₂ libre, establecido en vino tinto) provocó una inhibición de la transformación del selenito a compuestos orgánicos, probablemente debido a que el exceso de este compuesto puede afectar a la actividad de la levadura, llegando a incluso a inhibir su crecimiento y actividad fermentativa, de tal forma que no incorporase ni biotransformase el selenito.

Uno de los alimentos fermentados más consumidos a nivel mundial es el pan, por ello, el **enriquecimiento de pan con selenio** es otra atractiva vía de incorporación de este elemento en la alimentación. Los cereales son capaces de acumular y biotransformar el selenio proveniente del suelo en sus semillas, lo que ha provocado el desarrollo a nivel mundial de programas de biofortificación destinados a aumentar el contenido de selenio en las semillas y, por tanto, en las harinas resultantes. Entre los cereales, el trigo es uno de los cultivos donde más se está aplicando la biofortificación mediante aplicación del selenio bien al suelo (fertilizantes), o bien a las hojas (aplicación foliar). Sin embargo, existen numerosos factores a tener en cuenta para que la biofortificación tenga éxito como la capacidad de cada especie de planta para absorber el

selenio a través de la rizosfera, las condiciones atmosféricas, la compactación del suelo y su irrigación, el pH, etc. Además, las plantas sólo suelen incorporar un pequeño porcentaje del selenio adicionado durante su cultivo, y parte de él puede perderse en el procesado del fruto o cereal. Debido a estos inconvenientes, en este trabajo se optó por la alternativa de enriquecer el pan mediante la adición del selenio en la etapa de elaboración, ya que supone un ahorro considerable de tiempo y reactivos. Para ello, se elaboró pan blanco e integral llevando a cabo el enriquecimiento de dos maneras: por adición directa de $1\mu\text{g Se/g}$ a la masa, en forma de selenito sódico, donde la levadura es uno de los ingredientes; y por selenización previa de la levadura a utilizar con $33\mu\text{g Se/g}$, como selenito sódico, de manera que el pan selenizado resultante presentase $1\mu\text{g/g}$.

Como paso inicial se optimizaron las condiciones necesarias de fermentación y cocción para obtener unos panes con color, olor, sabor y textura adecuados. De esta manera, las condiciones óptimas fueron dejar fermentar la masa a 30°C durante 20 minutos, tras lo cual se cocinó a 200°C durante 25 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Además, se comprobó el efecto del uso de la levadura liofilizada o fresca en la panificación, observándose que los panes obtenidos con levadura fresca mostraban mejor aspecto, olor y sabor que cuando se utilizaba levadura liofilizada.

Una vez obtenidos los panes selenizados se pasó a cuantificar el contenido de selenio y sus especies en los mismos mediante análisis por dilución isotópica ICP-MS. Se empleó la modalidad de dilución isotópica de especies no específica o post-columna. Esta metodología permite utilizar un trazador con una forma química diferente a la especie a cuantificar. Para ello, el eluato de la columna cromatográfica se mezcla con el trazador, ^{77}Se -selenito, midiéndose la relación isotópica $^{78}\text{Se}/^{77}\text{Se}$. Esta variedad se emplea para cuantificar especies de selenio cuya estructura se desconoce o aquellas de las que, aun conociendo su identidad, no se dispone de patrón marcado isotópicamente para llevar a cabo un análisis por dilución de especies

específica. Uno de los problemas que presenta la modalidad de análisis por dilución isotópica post-columna es que no corrige los errores durante el proceso de extracción de especies.

El contenido de selenio total se determinó en la masa y el pan para evaluar posibles pérdidas debidas a las altas temperaturas alcanzadas en la cocción. Los contenidos de selenio encontrados en la masa selenizada y en el correspondiente pan selenizado fueron, respectivamente, 1.29 y 1.28 $\mu\text{g Se/g}$ para los elaborados con harina blanca, y 1.18 y 1.16 $\mu\text{g Se/g}$ para los elaborados con harina integral, observándose que su contenido de selenio no sufría cambios tras el proceso de cocción en ninguno de los dos métodos de enriquecimiento utilizados. Los panes control, es decir, aquellos elaborados sin selenio, presentaban de por sí una pequeña cantidad de selenio, que en el caso del pan blanco era 3 veces superior al del pan integral, siendo de 0.28 y 0.10 $\mu\text{g Se/g}$, respectivamente, y que procedía de la harina utilizada para su elaboración, la cual presentaba 0.28 $\mu\text{g Se/g}$ en el caso de la harina blanca y 0.09 $\mu\text{g Se/g}$ en la harina integral. Aunque se sabe que el contenido de selenio suele ser mayor en las harinas integrales que en las blancas, ya que parte del selenio se pierde en el procesado del grano, sin embargo, el origen de las harinas utilizadas en este trabajo se desconoce puesto que fueron adquiridas en tahonas, por lo que la diferencia en el contenido de selenio entre ambas no puede atribuirse a un sólo factor y puede deberse, por ejemplo, a que hayan sido cultivadas en suelos con contenido de selenio distintos.

Se consiguieron identificar y cuantificar las especies de selenio presentes en el pan, la masa cruda, la harina y la levadura selenizada, para lo cual se utilizó una hidrólisis enzimática con posterior análisis por LC-ICP-MS, utilizando distintos mecanismos de separación cromatográfica. En los extractos enzimáticos obtenidos la principal especie encontrada fue la SeMet. En el caso de los panes control, su contenido era el mismo que el de la correspondiente harina, el cual provendría de la biotransformación del selenio absorbido por la planta de trigo desde el suelo durante su cultivo. En cuanto a la masa cruda, contenía aproximadamente la

misma cantidad de SeMet que el pan, por lo que se puede considerar que no existieron pérdidas o degradación de esta especie durante el proceso de horneado.

Para obtener la mayor eficacia de la extracción de especies de selenio en este tipo de matriz, en este trabajo se optimizó una metodología analítica basada en la hidrólisis enzimática, realizando un estudio comparativo entre: extracción asistida por sonda de ultrasonidos, por microondas e incubación a temperatura controlada. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias en los rendimientos de extracción de SeMet entre ellas, que correspondían al 80% respecto del selenio total presente en el pan, lo que demostró que la sonda de ultrasonidos permite disminuir el tiempo de tratamiento con unos rendimientos cuantitativos, manteniendo la integridad de las especies. Por otro lado, debido a la problemática encontrada de que la propia proteasa puede contener pequeñas cantidades de especies de selenio como la SeMet, Se(IV) o Se(VI), y que su concentración varía de un lote a otro de proteasa, se trató de optimizar un método alternativo de extracción de especies de selenio sin utilizar enzimas, empleando para ello una hidrólisis ácida con HCl diluido. Desafortunadamente dicho tratamiento no dio buenos resultados, obteniéndose recuperaciones de SeMet del 7%. Aunque la hidrólisis ácida sea el procedimiento normalmente utilizado para la determinación de aminoácidos y existan estudios que indiquen una buena extracción y estabilidad de patrones de SeMet y SeCys, el éxito de este método depende claramente de la matriz utilizada. Esto se ratifica en otros trabajos, como por ejemplo en aquellos realizados en plantas de la especie *Brassica juncea*, donde tampoco obtuvieron buenos rendimientos al emplear la hidrólisis ácida. Esto puede ser debido a que es un tratamiento bastante agresivo y puede generar la pérdida de aminoácidos lábiles, o degradar las especies de selenio presentes, así como generar algún tipo de degradación de la propia matriz que dificulte la determinación de las especies. Por tanto, la extracción de especies óptima fue la hidrólisis enzimática con sonda de ultrasonidos. El método se validó analizando un material de referencia de levadura selenizada SELM-1.

Respecto a los diferentes tratamientos utilizados para enriquecer el pan, sí se observaron diferencias importantes. Por un lado, la adición directa de selenito sódico a la masa no proporcionó la biotransformación a SeMet deseada, siendo ésta muy pequeña y quedando el selenio en forma de otros compuestos intermedios desconocidos de bajo peso molecular. A pesar de que un estudio publicado recientemente consiguió la transformación parcial de selenito a SeMet a partir de su adición directa a la masa, dicha biotransformación representaba sólo entre un 10-50 % del selenio adicionado inicialmente. Una posible explicación para esta diferencia entre estudios podría ser que las condiciones de elaboración de la masa fueron diferentes, ya que mientras que en nuestros estudios se utilizó la receta básica de preparación del pan consistente en harina, agua, sal y levadura, los otros estudios, que consiguieron la transformación parcial a SeMet, adicionaron también azúcar y medio de cultivo de la levadura para elaborar la masa, lo que pudo proporcionar a la levadura los nutrientes necesarios para mejorar o acelerar la biotransformación en el proceso.

Los mejores resultados se obtuvieron preparando el pan con levadura selenizada. La selenización de la levadura se llevo a cabo a distintos tiempos de incubación de la levadura con el selenio (16, 72 y 96 horas), siendo superior la biotransformación a 96 horas. La posterior utilización de la levadura fresca selenizada en la panificación, sí permitió la biotransformación cuantitativa del Se(IV) a SeMet. Sin embargo, la levadura selenizada liofilizada proporcionó una menor acumulación del selenio adicionado, por lo que no se utilizó para los estudios posteriores. La selenización de la levadura es un proceso que ha sido ampliamente estudiado y optimizado, encontrándose un gran número de trabajos en la literatura. El control de las condiciones de selenización es crucial para obtener resultados reproducibles y la biotransformación principal a SeMet, siendo imprescindible utilizar un medio de cultivo con una fuente de carbono consistente en azúcares, temperatura no superior a 30°C y una ventilación constante.

Si bien la determinación del selenio total y sus especies en los alimentos supone una información muy útil, no es suficiente para estimar la eficacia nutricional de los alimentos enriquecidos en selenio, siendo necesario evaluar también su contenido en la fracción bioaccesible. Aunque es cierto que esa información no tiene por qué corresponderse con la absorción final de un compuesto (biodisponibilidad), ya que ésta depende de factores como edad, sexo, estado nutricional, la ingesta de medicamentos, así como de otros nutrientes en la dieta que puedan inhibir o intensificar el contenido de otros compuestos, etc., la estimación del selenio en la fracción bioaccesible proporciona una información realista de la cantidad de selenio liberado en el proceso digestivo del alimento, y que en principio estaría potencialmente a disposición del organismo. Para poder llevar a cabo dicho estudio se realizó una simulación de la digestión del alimento con sus tres etapas, bucal, gástrica e intestinal mediante un método *in vitro*, utilizando las enzimas digestivas amilasa, pepsina y pancreatina, respectivamente. Los resultados obtenidos mostraron que aproximadamente el 80% del selenio total se encuentra en la fracción bioaccesible para el pan blanco, mientras que este porcentaje se ve reducido en el caso del pan integral hasta un 40%. Esta disminución de la bioaccesibilidad en el pan integral podría deberse a su mayor contenido de fibra, un carbohidrato no digerible que puede disminuir la capacidad de las enzimas para actuar y liberar el selenio de ciertos compuestos o biomoléculas, puesto que también se reduce la capacidad de las proteínas y el almidón de ser digeridos. La distribución de las especies no varió durante el proceso de digestión gastrointestinal con respecto a las especies presentes inicialmente en el pan, encontrándose también SeMet en los extractos gastrointestinales del pan blanco enriquecido. Esto sugiere que la mayoría del selenio presente en el pan blanco es potencialmente aprovechable por el organismo. En otros estudios llevados a cabo por otros autores sobre la bioaccesibilidad de selenio presente en trigo biofortificado realizados en humanos, se observó que más del 80% del selenio era absorbido, con el correspondiente aumento del nivel de selenio en plasma.

Finalmente, se estudió la influencia que podría tener la propia elaboración de este alimento enriquecido, si se ejecuta de manera tradicional, como se haría en pequeños establecimientos o en casa, es decir, a pequeña escala (escala de laboratorio), en comparación con los procedimientos utilizados en la industria panificadora. El factor principal que influye en los resultados es la mezcla de ingredientes. Puesto que en este trabajo el pan se enriquece utilizando levadura selenizada, que representa sólo un 3% de total de los ingredientes, su uniforme distribución inicial en la masa es crucial para asegurar una ingesta idéntica de selenio, independientemente de la parte del alimento consumido. La comparación de la mezcla de ingredientes tras amasarlos de manera manual, incluso durante largos tiempos, con la mezcla mecánica, puso de manifiesto que para la elaboración de pan enriquecido en selenio es imprescindible utilizar un mezclador mecánico para conseguir una distribución homogénea de este elemento.

Este estudio muestra una alternativa a la biofortificación del trigo para la elaboración de pan enriquecido en selenio, obteniendo un producto enriquecido en SeMet en menor tiempo y utilizando pequeñas cantidades de reactivos. Además, demuestra que este alimento presenta una buena bioaccesibilidad por lo que podría ser un alimento adecuado para aumentar el contenido de selenio en la dieta en los países donde la ingesta de este elemento es deficitaria.

Más allá de la levadura selenizada, también pueden encontrarse estudios que ponen de manifiesto la capacidad de biotransformación del selenio por parte de otros microorganismos, como las bacterias. Este es el caso de la bacteria *Lactobacillus*, de la cual, aunque no existen tantos trabajos de investigación sobre ella como sobre la levadura, se ha demostrado su capacidad de biotransformar selenio inorgánico a especies como SeCys o SeMeSeCys. Esta bacteria se encuentra presente de forma natural en determinados vegetales como la col, perteneciente al género *Brassica*. Numerosos estudios llevados a cabo con estas plantas suministradas tanto a humanos como a animales, demuestran que presentan un efecto protector frente a distintos tipos de cáncer. Este efecto se asocia a su contenido en glucosinolatos y sus

derivados (tioisocianatos e indoles) así como de fenoles o vitamina C. Estos compuestos presentan propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, por lo que son alimentos con funciones muy interesantes y beneficiosas para la salud. El chucrut es un producto que se obtiene por la fermentación natural de col blanca, por acción de su bacteria endógena *Lactobacillus plantarum*, proceso durante el cual se generan productos que provienen de la hidrólisis de los glucosinolatos, como es el ascorbígeno. Debido a que el selenio también presenta propiedades antioxidantes y está asociado a funciones anticancerígenas, se quiso aprovechar la capacidad de biotransformación de esta bacteria para obtener **chucrut enriquecido en selenio** mediante su adición previa a la fermentación, y evaluar las propiedades del producto resultante.

Para los estudios realizados con *Lactobacillus*, y reflejados en esta memoria, se utilizaron coles blancas (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* cv. Megaton) cultivadas en la estación de invierno en el norte de España (La Rioja). Para la elaboración del chucrut se eliminaron las hojas externas y el corazón de la col, y se cortó la parte comestible de ésta en tiras para después mezclarlas exhaustivamente con una salmuera a base de NaCl y una disolución de selenito sódico de concentraciones comprendidas entre 1.5 y 8.0 µg Se/g. Luego, se procedió a su fermentación durante 7 días a temperatura ambiente. Tras su enriquecimiento se observó que esta bacteria era capaz de incorporar el selenio adicionado de manera cuantitativa en la fermentación de la col, sin existir diferencias entre las distintas concentraciones de selenio adicionadas.

La determinación de especies de selenio se realizó mediante una hidrólisis enzimática con proteasa, utilizando la energía de ultrasonidos focalizada, que proporcionaba la posibilidad de extraer en pocos minutos el selenio de manera cuantitativa. Mediante este tratamiento se observó que el chucrut enriquecido mostraba principalmente SeMeSeCys, un compuesto de selenio al que se le atribuyen en gran parte las propiedades anticancerígenas del selenio. Al aplicar la extracción sin enzimas se observó un alto contenido de esta especie no unida a proteínas, lo cual era previsible ya que se trata de un selenoamino ácido no proteinogénico. El

empleo de una disolución reguladora Tris-HCl (pH 7.5) como medio extractante en lugar de agua destilada, proporcionó un aumento de la recuperación de SeMeSeCys de un 57% (obtenido con agua destilada) a un 85%, respecto al selenio total. Una vez estudiada la biotransformación del selenio en la fermentación de la col, se evaluó el efecto de su adición en las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes naturales del chucrut, en la formación de indoles derivados de glucosinolatos, además de en la población microbiana de la col.

Como ya se ha comentado, el chucrut es considerado un alimento beneficioso para la salud, además de por su valor nutricional, por sus propiedades antioxidantes y su potencial anticancerígeno. La concentración de glucosinolatos y sus productos de hidrólisis como los tioisocianatos (ITC), indoles (indol-3-carbinol, I3C; o el indol-3-acetonitrilo, I3ACN) y ascorbígeno (ABG), fueron medidos en este alimento, ya que son compuestos relacionados con la reducción del cáncer y la inflamación celular. Mientras que el contenido de ABG, I3C y I3ACN se vio incrementado considerablemente al producirse la fermentación de la col, siendo el ABG el compuesto mayoritario en el chucrut, la adición de selenio produjo un aumento significativo en la producción de I3C, manteniéndose constante la concentración de los demás compuestos analizados. A pesar de que el motivo del aumento de estos compuestos, tanto durante la propia fermentación como debido a la adición de selenio, se desconoce, es un hallazgo importante debido a la potenciación de sus propiedades.

Por otro lado se estudió la variación del contenido de vitamina C durante la fermentación, ya que es uno de los compuestos antioxidantes mayoritarios en el chucrut junto con los fenoles, ambos capaces de prevenir daños celulares provocados por la presencia de radicales libres. En esta ocasión, el contenido de vitamina C disminuyó tras la fermentación, sin observarse ningún efecto debido a la adición de selenio. Esta disminución puede deberse a la formación de ascorbígeno, el cual consume ácido ascórbico en el proceso, por lo que el aumento de uno estaría ligado a la disminución del otro. Seguidamente se evaluó la capacidad antioxidante de la col cruda y del chucrut mediante el ensayo de capacidad de absorción de radicales oxígeno

(ORAC), observándose que el proceso de fermentación contribuía a aumentar dicha capacidad, probablemente debido a la formación de indoles derivados de glucosinolatos. Además, se cree que la capacidad antioxidante se potencia durante el proceso de troceado de la col. La presencia de selenio en el chucrut provocó un aumento adicional a dicha propiedad, lo que se atribuye a la formación de compuestos como la SeMeSeCys, conocido por su capacidad para eliminar radicales libres.

Los procesos antiinflamatorios y el sistema inmune se hallan relacionados, ya que una inflamación aguda es la reacción producida para prevenir posibles infecciones, sin embargo, cuando la inflamación es crónica puede suponer un peligro para la salud, puesto que está relacionada con el desarrollo de enfermedades, como la arterioesclerosis o el cáncer. Por ello es importante consumir productos con propiedades antiinflamatorias para prevenir los daños derivados de una inflamación crónica. En este trabajo se evaluó la capacidad antiinflamatoria del chucrut, poniendo en contacto éste con macrófagos que habían sido tratados con lipopolisacáridos de *Escherichia coli*, ya que este es el tratamiento que se utiliza para simular una infección y activar la inflamación. La respuesta de los macrófagos ante una infección es la liberación de ciertas sustancias proinflamatorias como las interleucinas o el óxido nítrico (NO), por lo que la presencia de un compuesto con propiedades antiinflamatorias produciría la disminución de estas sustancias. Por ello, se midió el contenido de NO liberado por los macrófagos inflamados, en presencia de la col cruda, de chucrut (col fermentada) y del chucrut enriquecido en selenio. A pesar de que todos ellos producían una reducción de la producción de NO, el chucrut enriquecido en selenio mostraba la mayor capacidad antiinflamatoria, seguido por la col fermentada y finalmente la col cruda. La capacidad antiinflamatoria del chucrut podría deberse a la formación de indoles derivados de glucosinolatos, que se producen durante la fermentación, y puesto que el ABG es el derivado de glucosinolatos mayoritario en el chucrut, se realizó el estudio de su efecto individual sobre los macrófagos. A pesar de que el

ABG sí redujo la formación de NO, su inhibición fue débil por lo que su contribución al potencial inhibidor por parte del chucrut sería pequeña y su efecto se debería también a otros como el I3C. Del mismo modo, se evaluó el potencial inhibidor de NO de la SeMeSeCys, que producía una reducción más marcada que en el caso del ABG. En estudios realizados por otros autores con células, se ha mostrado también este efecto antiinflamatorio del selenio, además de una capacidad para regular la expresión de ciertas enzimas proinflamatorias. Existen diversos trabajos que demuestran que el selenio tiene un papel importante en el sistema inmune, aumentando su respuesta, e incluso disminuyendo la virulencia de enfermedades, como el VIH, o reduciendo la incidencia de tiroiditis.

Como ya se ha comentado, los microorganismos pueden verse afectados por la presencia de determinados elementos en su entorno, por lo que se estudió el efecto que la adición de selenio pudiera tener en la flora microbiana del chucrut. La población microbiana dominante de la col son bacterias aeróbicas mesófilas, seguidas por bacterias anaeróbicas (del género *Lactobacillus*) y coliformes totales (aeróbicos y anaeróbicos). Al comenzar la fermentación, la concentración de las bacterias anaeróbicas mesófilas y *Lactobacillus* se ve aumentada. Sin embargo, al avanzar la fermentación la bacteria *Lactobacillus* experimenta un crecimiento celular muy superior al del resto de bacterias, convirtiéndose en la población dominante y por tanto en la responsable principal de la fermentación de la col y transformación del selenio. La adición de selenio provocó una diferencia más marcada entre el contenido de bacterias mesófilas y *Lactobacillus*, disminuyendo el crecimiento de las primeras y aumentando el de las segundas, produciéndose fenómenos de competición. Se cree que este efecto puede deberse a un efecto prebiótico que presenta el selenio favoreciendo el crecimiento de la bacteria *Lactobacillus plantarum*, el cual ha sido también observado por otros autores en estudios *in vitro* con diferentes especies de *Lactobacillus*.

Tras estos resultados se decidió comprobar si una modificación de la composición de la flora presente en la col produciría variaciones en la transformación del selenio. Para ello, se añadió

una cantidad adicional de bacteria *Leuconostoc mesenteroides* al comienzo de la fermentación y se comparó con la fermentación natural, sin encontrarse diferencias ni en la incorporación de selenio, que seguía siendo cuantitativa, ni en las especies de selenio formadas, con la SeMeSeCys como principal compuesto de selenio.

Los estudios realizados con *Lactobacillus plantarum* para elaborar chucrut enriquecido en selenio demuestran que este elemento puede aumentar el carácter antioxidante y antiinflamatorio de un alimento saludable como es el chucrut, debido a la formación de la especie SeMeSeCys, lo cual es de gran importancia por su potencial efecto reductor en el desarrollo de ciertas enfermedades.

Uno de los aspectos más importantes del trabajo realizado es la capacidad de biotransformación del selenito a SeMeSeCys durante la preparación del chucrut. Este proceso natural se aplicó para producir ⁷⁷SeMeSeCys cuando el selenio se adicionaba como ⁷⁷Se-selenito. Este procedimiento constituye una alternativa muy interesante para obtener una especie de selenio marcada isotópicamente, frente a los métodos existentes en la actualidad, que requieren condiciones químicas agresivas y largos tiempos de preparación. La especie marcada puede emplearse para la cuantificación de especies mediante dilución isotópica de especies específica o como trazador para estudios metabólicos.

Basándonos en ello, se llevó a cabo el **estudio del metabolismo y la acumulación de la SeMeSeCys en el organismo de ratas** alimentadas con ⁷⁷SeMeSeCys-chucrut obtenido según los estudios señalados con anterioridad. En este trabajo también se aplicó el análisis por dilución isotópica para determinar el selenio total, y la modalidad post-columna utilizando como trazador ⁷⁷Se-selenito para la determinación de las especies en los controles (sin enriquecer con ⁷⁷Se). En el caso de las muestras enriquecidas inicialmente con ⁷⁷Se, se empleó la dilución isotópica inversa, para lo cual se usó como trazador selenito de abundancia isotópica natural. Como ya se comentó, esta técnica permite la cuantificación del selenio a través de la medida de las

abundancias relativas de sus isótopos, $^{78}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ para la dilución isotópica convencional y $^{77}\text{Se}/^{78}\text{Se}$ para la inversa.

Para realizar los ensayos *in vivo* se utilizaron ratas *Wistar*, que fueron divididas en dos grupos, a cada uno de los cuales se les suministró una dieta de distinta composición: una dieta a base de pienso (AIN-93M) con un 20% de chucrut liofilizado (ratas control), y una dieta a base de pienso (AIN-93M) con un 20% del ^{77}Se -chucrut liofilizado. La dieta suministrada contenía 0.10 $\mu\text{g/g}$ de selenio cuando se trataba del chucrut control, y 1.21 $\mu\text{g/g}$ de selenio al añadir chucrut selenizado. Las especies de selenio presentes en el pienso eran SeMet y Se(IV) en sus abundancias isotópicas naturales, por lo que su seguimiento se realizó midiendo ^{78}Se , mientras que el chucrut enriquecido sólo presentaba SeMeSeCys, como ya se comentó, y su seguimiento se realizó midiendo ^{77}Se . Además de selenio, el pienso contenía otros nutrientes entre los que estaban Mg, Mo, Zn y Cu.

Transcurrido el tiempo de exposición, se sacrificaron los animales y se analizó el contenido de selenio total en hígado, riñón, corazón, testículos y cerebro, encontrándose que en el grupo control los mayores niveles de este elemento estaban en el riñón, los testículos y el hígado, con concentraciones de 1.9, 3.4 y 3.7 $\mu\text{g Se/g}$, respectivamente, mientras que tras la suplementación se producía un notable incremento del contenido de selenio en el riñón y el corazón hasta concentraciones de 4.1 y 1.7 $\mu\text{g Se/g}$, respectivamente, seguido por un ligero aumento a 4.4 $\mu\text{g Se/g}$ en el hígado, permaneciendo casi inalterada la concentración de selenio en el cerebro y los testículos en 0.6 y 2.7 $\mu\text{g Se/g}$. Estos resultados sugieren una clara preferencia de acumulación del selenio en determinados órganos. Según trabajos publicados en la bibliografía, el hígado y el riñón son considerados órganos acumuladores de selenio, lo que explicaría que fueran los órganos con mayor contenido de selenio en el grupo control. Sin embargo, en nuestro caso, sólo se observó un aumento considerable del contenido de selenio tras la suplementación del chucrut selenizado en el caso del riñón y no en el hígado, lo que podría deberse al hecho de que el riñón está involucrado en procesos de excreción del cuerpo, donde el hígado no participa activamente.

Varios estudios realizados en pescados, aves y ratas muestran que el riñón y el músculo incrementan el contenido de selenio de forma considerable cuando se administra en dietas o de manera intravenosa. Por otro lado, se ha observado en algunos estudios que el corazón presenta una elevada sensibilidad a la deficiencia de selenio, por lo que la suplementación podría afectarle del mismo modo, explicando su destacado aumento, conjuntamente con el riñón. Es conocido que los órganos con una actividad biológica importante como pueden ser el cerebro o los testículos, suelen mantener sus niveles de selenio invariables ante la deficiencia de este elemento para mantener su actividad, a expensas de otros órganos, por lo que es posible que se comporten de igual forma ante una ingesta adicional de este elemento.

En el estudio del metabolismo del selenio, también es importante saber si una ingesta adicional del mismo podría producir variaciones en otros elementos esenciales para el organismo, motivo por el cual se llevó a cabo el análisis de otros nutrientes ingeridos en la dieta (Mo, Cu, Zn, Mg) tanto en los órganos control como en los órganos de ratas alimentadas con la dieta rica en selenio. De forma general, no se produjo variación en el contenido de estos elementos al administrarse una cantidad adicional de selenio, sin embargo, en los órganos donde mayor era el aumento de selenio tras la suplementación, es decir, en el corazón y riñón, sí se observó un incremento considerable de los metales evaluados. Estudios realizados por otros autores, por ejemplo en plantas, como el caso del rábano, han mostrado que la administración de selenio producía una disminución en la acumulación de hierro y molibdeno, al mismo tiempo que aumentaba la translocación de cobre. En otros casos como brócoli y aves, y respecto a otros metales (Cd y Hg), la suplementación con selenio también provocaba una disminución de la acumulación de éstos. Además del selenio, este efecto se ha observado con otros elementos, como por ejemplo el zinc, que al ser suplementado a ratas disminuía el contenido de Mo, Ca, Se y Fe. A pesar de que los motivos para este efecto no están muy estudiados, se cree que podría deberse o bien a la formación de complejos de selenio con dichos metales, o bien a un efecto

sinérgico o antagónico de los mismos. Hay que tener en cuenta que todos estos elementos intervienen en el complejo sistema redox del organismo, si un elemento varía su concentración trae como consecuencia una alteración del resto para mantener el equilibrio.

Los estudios de especiación en los tejidos biológicos presentan gran dificultad a la hora de llevar a cabo una correcta identificación y cuantificación de especies, debido a la elevada complejidad de estas matrices, así como a los bajos niveles de selenio presentes como biomoléculas en los órganos considerados. Por ello, el desarrollo de una metodología analítica que permita una extracción cuantitativa de las especies de selenio manteniendo la estabilidad de éstas es crucial. Como se comentó en la introducción, el selenio puede entrar a formar parte de las proteínas en el organismo de dos formas, como SeCys dando lugar a las selenoproteínas, o como SeMet originando las proteínas que contienen selenio. La principal problemática existente en la determinación de SeCys reside en su gran inestabilidad, por ser altamente reactiva debido al grupo seleniuro que presenta, por lo que es necesario aplicar métodos que protejan esta especie una vez haya sido extraída. La carbamidometilación (CAM) es un procedimiento que permite proteger la SeCys metilándola tras romper los enlaces Se-Se y Se-S con un agente reductor. Este procedimiento, realizado previamente a la hidrólisis enzimática, ha sido aplicado con éxito en la extracción de esta especie en muestras de huevos, pescados y plantas.

A fin de extraer cuantitativamente los selenoamino ácidos presentes en los distintos órganos estudiados en este trabajo, se llevó a cabo un estudio comparativo de la extracción de especies, con y sin aplicación de una etapa de carbamidometilación previa a la hidrólisis enzimática. Para la digestión enzimática se empleó una mezcla de proteasa y lipasa en medio extractante Tris-HCl (pH 7.5) mediante incubación a temperatura controlada. A pesar de que se ha demostrado en varios trabajos que la sonda de ultrasonidos supone un ahorro de tiempo considerable, dependiendo de la matriz y las especies químicas su uso puede no ser adecuado. Los trabajos de especiación publicados sobre el análisis de tejidos biológicos animales han mostrado que, en este tipo de muestras, un tratamiento más suave como la incubación a temperatura controlada

proporciona mejores resultados, evitando la degradación de las especies o de la propia matriz. Respecto a la carbamidometilación, puesto que el selenio en muestras biológicas suele estar unido a proteínas o péptidos, el uso de un agente desnaturalizante de proteínas como la urea ayuda a una mejor extracción. Por ello, se realizó un primer paso de apertura de proteínas tratando la muestra con urea 7 M, para después reducir los enlaces de selenio con ditioneitol (DTT) y posteriormente proteger los residuos de SeCys mediante metilación con yodoacetamida (IAM). Finalmente el exceso de IAM se eliminó añadiendo DTT. Tras ello fue necesario diluir la concentración de urea hasta 1M antes de aplicar la hidrólisis enzimática, ya que se sabe que elevadas concentraciones de urea pueden tener un efecto negativo sobre la actividad de ciertas enzimas. Este proceso de carbamidometilación también fue aplicado a los patrones de selenio convencionales para obtener sus análogos metilados y utilizarlos como patrones en la especiación de las muestras.

Mediante CAM, seguida de la hidrólisis enzimática y posterior análisis por HPLC-ICP-MS, se observó un pico cromatográfico correspondiente a la CAM-SeCys en todos los órganos estudiados, tanto de los animales control como en los suplementados. Además, aparecía otro pico coincidente con el CAM-Se(IV), que presentaba mayor intensidad en los órganos provenientes de ratas alimentadas con dieta selenizada. Para comprobar la identidad de estas dos especies se comparó con la hidrólisis enzimática convencional sin emplear una etapa previa de carbamidometilación. Sin embargo, dicho tratamiento sólo mostró la presencia de SeCys₂, sin encontrarse Se(IV) en las muestras, por lo que el pico coincidente con CAM-Se(IV) debe corresponder a otra especie que coeluye con ésta. El uso de dos mecanismos de separación cromatográfica, intercambio aniónico y fase inversa C8, no permitió la identificación de dicha especie debido a la falta de patrones con los que compararla. Además de las especies ya mencionadas, en el caso del riñón y el hígado de las ratas suplementadas, también se observó SeMeSeCys sin biotransformar.

Para tratar de identificar la especie de selenio desconocida se procedió a la recolección de la fracción correspondiente a dicho pico, tras inyectarlo por cromatografía de intercambio aniónico y posteriormente por fase inversa para eliminar las sales y separarlo de los demás picos. Ni el análisis directo por ESI-MS/MS de esa fracción, ni el acoplamiento de una columna de fase inversa C18, para eliminar las posibles interferencias de la matriz que pudieran interferir en la ionización, dieron resultados satisfactorios, por lo que esta técnica tampoco proporcionó información acerca de la estructura de esta especie desconocida. Esto puede ser debido a las bajas concentraciones de selenio en estas muestras, ya que los límites de detección de las técnicas moleculares con espectrometría de masas son muy altos respecto a los niveles que se precisan para el análisis de ultratrazas, lo que se suma a la baja ionización de los selenocompuestos.

La distribución de los isótopos ^{78}Se y ^{77}Se proporciona información sobre la biotransformación sufrida por el selenio proveniente de la dieta sin enriquecer, donde el selenio estaba presente en pequeñas cantidades en forma de $^{78}\text{SeMet}$ y $^{78}\text{Se(IV)}$, así como de la dieta enriquecida con $^{77}\text{SeMeSeCys}$ -chucrut. Todas estas especies originales de la dieta dieron lugar en los órganos a SeCys y a la especie desconocida, puesto que ambas estaban presentes en los órganos control y en los enriquecidos. Aunque parece que la SeMeSeCys mostraba mayor tendencia a formar la especie desconocida, puesto que ésta era más intensa en el isótopo ^{77}Se en casi todos los órganos provenientes de una dieta enriquecida, en el caso del corazón esta especie era mayoritaria para el isótopo ^{78}Se , es decir, en esta ocasión provenía de la $^{78}\text{SeMet}$ o del $^{78}\text{Se(IV)}$ de la dieta control.

Otros estudios realizados por otros autores con ratas mostraron que el selenio administrado por vía intravenosa tanto en forma de SeMeSeCys , SeMet como Se(IV) , se incorporaba a selenoproteínas como la selenoproteína P o la glutatión peroxidasa, aunque unas especies parecían ser más efectivas en dicha incorporación que otras. Este hecho podría justificar la presencia de SeCys en los órganos analizados en el presente trabajo, puesto que ésta es el

componente clave de esas biomoléculas. También se observó la presencia de bajas concentraciones de SeMeSeCys en hígado y riñón, lo que implica que esta especie llega intacta a dichos órganos antes de metabolizarse. Por otro lado, a pesar de que el origen del pico desconocido de selenio no está claro, se sabe que puede proceder de cualquiera de las tres especies administradas puesto que se encuentra en muestras suplementadas y en muestras control. En base a la información publicada y los estudios realizados hasta la fecha sobre el metabolismo del selenio, se sabe que tanto la SeMeSeCys como la SeMet pueden metabolizarse produciendo especies intermedias como el metilselenol, el seleniuro de hidrógeno o el ácido metilselenínico antes de que pasen a formar parte de las proteínas o se conviertan en selenoazúcares o trimetilselenonio (TMSe) para su excreción. El TMSe suele formarse en casos de una elevada ingesta de selenio, y varios estudios demuestran que tras 48 horas es excretado del cuerpo. En este trabajo no se observó TMSe en el riñón o el hígado, que son los órganos donde podría aparecer antes de su excreción, por lo que se descartó dicha especie. Además, el hecho de que esta especie fuese detectada también en órganos como el cerebro o el corazón descarta que sea un metabolito de excreción urinario. Por tanto, esta especie formada únicamente bajo condiciones de carbamidometilación sugiere la transformación de especies en dichas condiciones.

La cuantificación de todas las especies de selenio no podría haberse realizado sin la aplicación de la dilución isotópica post-columna o inespecífica, que permite la cuantificación de especies de las que se desconoce su estructura molecular o de las que se carece de patrón, ya que el trazador se adiciona posteriormente a la separación cromatográfica en forma de una especie diferente a la de interés. La principal problemática de esta modalidad de dilución isotópica es que no permite la corrección de pérdidas o de bajas recuperaciones de extracción anteriores a la homogeneización entre muestra y trazador, sin embargo, en este tipo de casos es la única alternativa. En nuestro caso, la eficacia de la extracción de especies es claramente dependiente del órgano, comprendiendo entre un 50 y un 100% del selenio total en función del órgano. En

general, los órganos de los animales control presentaban mayor contenido de SeCys y menor cantidad de la especie desconocida, mientras que la suplementación originaba un aumento de la especie desconocida a expensas de la SeCys, que disminuía su concentración, siendo el hígado, riñón y los testículos los órganos con mayor cantidad de ambas especies, aunque tras la suplementación, los testículos disminuían notablemente el contenido de estas especies al mismo tiempo que el corazón aumentaba el nivel de la especie desconocida.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran un procedimiento interesante para estudiar y seguir la transformación de especies de selenio administradas a animales a través de la dieta, mediante el uso de especies marcadas isotópicamente, contribuyendo al conocimiento sobre el metabolismo del selenio en animales, y proporcionando información para avanzar en la elucidación de este metabolismo, aún por definir. Gracias al uso de herramientas como la dilución isotópica inespecífica en la actualidad es posible la cuantificación de especies desconocidas, lo cual hace algunos años hubiera sido imposible de realizar. Una vez más se ha corroborado que el selenio, tanto orgánico como inorgánico, es principalmente incorporado a las selenoproteínas en forma de SeCys, las cuales son distribuidas por el organismo. Sin embargo, estos resultados también muestran que existen otras especies intermedias que requieren de más estudios para su determinación, y del uso de técnicas con mayores prestaciones a nivel de detección de biomoléculas de selenio a nivel de ultratrazas.

VII.CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes de este trabajo se resumen a continuación:

- El desarrollo de alimentos fermentados enriquecidos en selenio se ha llevado a cabo con éxito empleando para ello microorganismos pertenecientes al género *Saccharomyces* y *Lactobacillus*, los cuales participan comúnmente en procesos de fermentación. Estos microorganismos han demostrado un elevado potencial para acumular y biotransformar selenio durante la producción de alimentos mediante procesos de fermentación. Estos trabajos pueden considerarse como un primer paso para estudios futuros con el fin de obtener alimentos comerciales que permitan disminuir la deficiencia de selenio.
- En función del microorganismo involucrado en la fermentación, existían diferencias en la biotransformación de selenio, ya que mientras que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* transformaba el selenito principalmente a SeMet, la bacteria *Lactobacillus plantarum* producía SeMeSeCys. Estos dos compuestos de selenio presentan gran importancia por ser considerados agentes antioxidantes y anticancerígenos.
- La levadura *Saccharomyces cerevisiae* incorpora el selenio a sus propias proteínas en forma de SeMet, por lo que dicha levadura debe ser componente del producto final para poder garantizar la ingesta de SeMet. Por este motivo, alimentos como el vino y la cerveza presentan pequeñas cantidades de esta especie, mientras que los alimentos como el pan o la cerveza turbia (con la levadura en ellos) sí muestran elevadas cantidades de SeMet. La aplicación de la hidrólisis enzimática fue crucial para poder obtener buenas recuperaciones de SeMet, ya que ésta se encuentra unida a las proteínas en la levadura. Además, esta especie mostró elevada bioaccesibilidad (80%) en estudios llevados a cabo con pan blanco selenizado, después de la aplicación de un proceso de

digestión gastrointestinal *in vitro*. Sin embargo, en el caso del pan selenizado preparado con harina integral, la bioaccesibilidad del selenio fue solamente del 40%.

- La formación de SeMeSeCys en el chucrut enriquecido en selenio, aumentó las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes de este alimento, además de incrementar el contenido de otros compuestos como indoles derivados de glucosinolatos, que son considerados agentes anticancerígenos, con lo que la adición de selenio contribuía a hacer del chucrut un alimento aún más saludable.
- Se ha demostrado la utilidad del empleo de especies marcadas isotópicamente como trazadores para seguir la biotransformación del selenio en la elaboración de alimentos así como su metabolismo en el organismo. En este trabajo se ha utilizado para controlar la transformación de selenito en la producción de chucrut y para estudiar el metabolismo de SeMeSeCys en el organismo de ratas.
- La distribución del selenio en el organismo de ratas tras su suplementación con este elemento, dependía en gran medida del órgano analizado, siendo el riñón y el corazón los más afectados por la adición a la dieta de chucrut enriquecido en selenio. Por otro lado, en el caso de los órganos que habían experimentado un mayor incremento de la concentración de selenio tras la suplementación de la dieta, también se observó una modificación del contenido de otros minerales como el Cu, Zn, Mg y Mo, que también habían sido ingeridos con la dieta, por lo que se cree que podría existir algún tipo de interacción entre estos elementos.
- La extracción de especies de selenio de matrices complejas, como es el caso de los órganos de los animales de experimentación ensayados, constituye la etapa más crítica

en los estudios de especiación. El desarrollo de la metodología analítica para analizar estas muestras mediante el proceso de carbamidometilación permitió determinar la SeCys, que es el selenoamino ácido clave de las selenoproteínas, además de otra especie de selenio sin identificar que requiere de más estudios para su elucidación.

- El empleo de la dilución isotópica en el modo inespecífico fue imprescindible para cuantificar el compuesto de selenio desconocido encontrado en los órganos de rata. Sin embargo, es necesario continuar optimizando el proceso de extracción de especies hasta alcanzar recuperaciones del 100%, puesto que esta modalidad de dilución isotópica no permite corregir las pérdidas producidas antes de la homogeneización del trazador con la muestra.

**VIII. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN
RELACIONADOS CON LA TESIS**

VIII. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN RELACIONADOS CON LA TESIS

VIII. CAPÍTULO 1. MIGRACIÓN DE ANTIMONIO DESDE ENVASES DE PET A SIMULANTES ALIMENTARIOS REGULADOS POR LA UNIÓN EUROPEA

El antimonio es considerado un contaminante prioritario por la Unión Europea, ya que se le han atribuido efectos cancerígenos, aunque al igual que otros elementos, dependiendo de la especie química, el antimonio presenta mayor o menor toxicidad, siendo el Sb(V) menos tóxico que el Sb(III). El trióxido de antimonio es comúnmente utilizado como catalizador en el proceso de elaboración del polietileno de tereftalato (PET), material que es muy utilizado como envase de alimentos y bebidas, llegando a contener hasta 190-300 mg Sb/kg PET, por lo que debe controlarse la posible migración de este elemento al alimento que contiene para evitar posibles efectos tóxicos. En el trabajo (**“Migration of antimony from PET containers into regulated EU food simulants”**, *Food Chemistry* (2013), 141: 816-822), presentado en la sección VIII.1., se evaluó la posible migración del antimonio desde botellas de PET en diferentes simulantes alimentarios siguiendo el Reglamento UE 10/2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. Este reglamento unifica las matrices y los procedimientos para realizar los ensayos sobre migración desde envases plásticos, permitiendo obtener resultados comparables entre distintos laboratorios. Se utilizaron simulantes de distintos tipos de alimentos: agua destilada en lugar de agua potable; ácido acético 3% sustituyendo alimentos con un pH inferior a 4.5 como zumos o vinagre; etanol 10% simulando bebidas alcohólicas de baja gradación; y etanol 20% para representar alimentos grasos y aceites, así como bebidas de grado alcohólico de hasta un 20%. También se analizaron alimentos reales (aceite, el agua o vinagre) para compararlos con los simulantes. Además del contenido total de antimonio extraído del PET, se realizó la especiación del mismo utilizando distintas técnicas como HPLC-ICP-MS y HG-AFS, esta última debido a la selectividad que presenta frente a la formación únicamente del hidruro de Sb(III) y no del Sb(V). La metodología analítica fue validada utilizando un material de referencia, para antimonio, de agua (SRM 1640). Los

resultados mostraron que las cantidades extraídas de antimonio en los simulantes se encontraban por debajo de los límites máximos permitidos ($40 \mu\text{g Sb/kg}$, según la Unión Europea), estando principalmente en forma de Sb(V) . Esto demuestra la baja tendencia del antimonio para migrar a los alimentos en condiciones normales, por lo que su extracción no supondría un riesgo. En el caso de las muestras reales los resultados fueron similares a los obtenidos con los simulantes, a excepción de en el caso del vinagre, donde también se extraía un complejo de acetato de antimonio. Adicionalmente se estudió el efecto de otros parámetros en la extracción del antimonio, como son las altas temperaturas y la reutilización del envase. No se observaron efectos en la extracción a temperaturas de hasta 60°C en ninguno de los simulantes, sin embargo, la reutilización mostró que se producía un máximo de extracción durante su primera utilización, disminuyendo en posteriores usos, a excepción de en el caso del ácido acético que parecía aumentar la migración con cada uso, posiblemente debido a una degradación del polímero por acción del medio ácido.

Este estudio permitió evaluar los posibles riesgos provocados por la migración de antimonio desde botellas PET en alimentos, obteniendo resultados comparables con otros centros y países, al emplear las directrices de un Reglamento actual de la Unión Europea, lo cual permite armonizar los resultados obtenidos por la comunidad científica. Además, este estudio podría considerarse como un inicio para el futuro estudio del comportamiento de alimentos líquidos, como son el vino o la cerveza estudiados en esta tesis, conservados en ocasiones en este tipo de envases. Así mismo se podría estudiar el efecto de la presencia del selenio sobre la mayor o menor presencia de antimonio en el alimento considerado, proveniente de la migración.

VIII.1. MIGRACIÓN DE ANTIMONIO DESDE ENVASES DE PET A SIMULANTES ALIMENTARIOS REGULADOS POR LA UNIÓN EUROPEA.

“Migration of antimony from PET containers into regulated EU food simulants”, *Food Chemistry* (2013), 141: 816-822.

Este trabajo fue presentado en:

“XXIII Reunión Nacional de Espectroscopia – VII Congreso Ibérico de Espectroscopia”,
Córdoba, España, Septiembre, 2012.



Migration of antimony from PET containers into regulated EU food simulants



María Sánchez-Martínez, Teresa Pérez-Corona, Carmen Cámara, Yolanda Madrid *

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Science, Complutense University of Madrid, Avenida Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 December 2012

Received in revised form 14 February 2013

Accepted 18 March 2013

Available online 26 March 2013

Keywords:

Antimony

PET containers

Sb migration

Food simulants

ICP-MS

HG-AFS

ABSTRACT

Antimony migration from polyethylene terephthalate (PET) containers into aqueous (distilled water, 3% acetic acid, 10% and 20% ethanol) and fatty food simulants (vegetable oil), as well as into vinegar, was studied. Test conditions were according to the recent European Regulation 10/2011 (EU, 2011). Sb migration was assayed by ICP-MS and HG-AFS. The results showed that Sb migration values ranged from 0.5 to 1.2 $\mu\text{g Sb/l}$, which are far below the maximum permissible migration value for Sb, 40 $\mu\text{g Sb/kg}$, (EU, Regulation 10/2011). Parameters as temperature and bottle re-use influence were studied. To assess toxicity, antimony speciation was performed by HPLC-ICP-MS and HG-AFS. While Sb(V) was the only species detected in aqueous simulants, an additional species (Sb–acetate complex) was measured in wine vinegar. Unlike most of the studies reported in the literature, migration tests were based on the application of the EU directive, which enables comparison and harmonisation of results.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Polyethylene terephthalate (PET) is the most widespread polymer used for the manufacture of packaging and films in contact with food, especially for beverages and drinking water (Bach, Dauchy, Chagnon, & Etienne, 2012). From PET containers, additives and residual chemical compounds of the polymer may migrate into food. Antimony trioxide (Sb_2O_3 ; CAS Registry no. 0001309-64-4) is the main catalyst used in PET synthesis (Pang, Kotek, & Tonelli, 2006), resulting in an antimony content in commercial PET resins ranging from 190 to 300 $\mu\text{g Sb/g}$ (Duh, 2002). Sb has also been considered as a priority pollutant by the European Union (EU) and the United States Environmental Protection Agency (US EPA) (Shotyk, Krachler, & Chen, 2006) setting the Maximum Contaminant Level (MCL) to 5 $\mu\text{g Sb/l}$ (EC, 2003) and to 6 $\mu\text{g Sb/l}$ (US EPA, 2009), respectively. The toxicity of antimony depends on its chemical form and oxidation state, and compounds of trivalent antimony are generally more toxic than pentavalent forms (Filella, Belzile, & Lett, 2007; Saracoglu, Soylak, Dogan, & Elci, 2003). Antimony leaching from PET into food products during storage implies a possible health hazard for humans. Different studies have already reported Sb leaching from PET containers into drinking water and juices. Shotyk et al. (2006) first provided evidence of Sb leaching from PET containers into drinking water. Sb concentration in 132 brands of bottled water from 28 countries was

determined, and Sb contents ranged from 0.156 to 0.343 $\mu\text{g/l}$, which is some 100-fold higher than the blank values from unbot-tled water.

A similar study was performed by Westerhoff, Prapaipong, Shock, and Hillareau (2008) in nine commercially available bottled waters from the southwestern US, here the antimony content ranged from 0.095 to 0.521 $\mu\text{g/l}$. The effect of temperature and storage time on antimony release was also studied. The rate of antimony released was fitted to a power function model to obtain a temperature- and time-dependent relationship for antimony leaching. The authors concluded that below 60 °C only a small fraction of the antimony from PET is released into the water, however the situation changes when higher temperatures are reached. Keresztes et al. (2009) investigated Sb leaching from PET packaging material into 10 different brands of still (non-carbonated) and sparkling (carbonated) Hungarian mineral water. The Sb concentration of still mineral water was lower than that of sparkling under identical storage conditions. Only at storage under extreme light and temperature conditions, Sb concentration exceeded 2 $\mu\text{g/l}$. The authors also pointed out that the extent of Sb leaching from PET recipients of different mineral water brands can differ by even one order of magnitude in experiments conducted under the same experimental conditions.

Hansen and Pergantis (2006) determined Sb in a selection of different juices, mainly of red fruit juices, packed in either bottles of PET or other commonly used container materials. The study was motivated by the fact that fruit juices contain high amounts of several organic acids, such as citric acid, malic acid and ascorbic acid, known to be efficient extractants of Sb. Juices bottled in PET

* Corresponding author. Tel.: +34 913945145.

E-mail address: ymadrid@quim.ucm.es (Y. Madrid).

contained significantly much more Sb (0.28–1.05 µg/l) than those bottled in Tetra Pak (0.07 µg Sb/l), glass recipients (0.28–0.30 µg Sb/l) or aluminium cans (0.24–0.56 µg Sb/l). Speciation analysis revealed that either the more toxic inorganic Sb(III) ($44 \pm 17\%$) or a Sb(V)–citrate complex of unknown toxicity ($41 \pm 20\%$) was present as the main Sb species in the juices. In a follow-up study, the same authors (Hansen et al., 2010) found up to 17-fold higher concentrations of Sb compared to the previous reports. Antimony concentrations up to a factor of 2.7 above the EU limit for drinking water were found in commercial juices, though it remains unclear whether this amount was introduced by leaching from the packaging material or during the manufacturing process. The authors postulated the need of further studies.

The colour of the PET bottle is also an important parameter; Westerhoff et al. (2008) observed that the release of Sb into ultrapure water was four times higher from clear PET bottles, compared to blue-coloured ones. In their study, equally sized PET samples (clear and blue) were incubated in 1 L of ultrapure water at 60 °C for 10 days. Opposite behaviour was observed by Reimann, Birke, and Filzmoser (2010), who found that Sb leaching is higher for dark bottles compared to clear ones.

Welle and Franz (2011) investigated antimony concentration in 67 PET samples from the European bottle market. A mean value of 224 ± 32 µg Sb/g PET was found. The migration of antimony into beverages was also predicted by mathematical modelling of migration for different surface/volume ratios and antimony bottle wall concentrations. The authors postulate that consumers exposure to antimony, by its migration from PET bottles into beverages and even into edible oils, reaches approximately 1% of the current tolerable daily intake (TDI), established by World Health Organisation (WHO) (WHO, 2003).

As shown, literature results for Sb leaching from PET containers into food are still rather inconsistent, with values often scattered over a wide concentration range (Keresztes et al., 2009; Shotyik et al., 2006). These differences may be explained by the variety of exposure conditions employed. Under these conditions, it is difficult to draw realistic conclusions about the consideration of Sb as a health hazard for consumers. Factors contributing to the inadequate harmonisation of the results include, lack of application of a systematic protocol to carry out migration assays (size of material, temperature, contact time and food simulants) and lack of use of a common measurement process. In order to harmonise migration test results, the European Union (EU) has published a number of Directives setting the basic rules for migration testing of packaging materials intended to come into contact with foodstuffs. In this context, plastic materials are covered by the recent regulation 10/2011 (EU, 2011) published in the Official Journal of the European Union. The conformity of a plastic material to come in contact with food is based on migration tests. The overall migration limit should not exceed 10 mg of the total constituents released from 10 cm² of the packaging surface. Specific migration limits (SML) are also provided for some substances on the positive list, e.g. 40 µg/kg, in the case of Sb₂O₃, expressed as Sb. However, the determination of such low Sb concentrations requires very specific and sensitive analytical techniques. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and atomic fluorescence spectrometry coupled to hydride generation (HG-AFS) have been widely applied for trace antimony determination (Miravet, López-Sánchez, & Rubio, 2004; Westerhoff et al., 2008). Antimony determination by HG-AFS strongly depends on its oxidation state. Nevertheless, this effect has been employed to carry out speciation studies, as an alternative to the use of hyphenated techniques based on coupling of high performance liquid chromatography (HPLC), capillary electrophoresis (CE) or gas chromatography (GC) to atomic and mass spectrometry (ICP-MS) detectors (Hansen & Pergantis, 2008; Smichowski, Madrid, & Cámara, 1998).

The aim of this work was to study antimony migration from PET bottles into food stimulants, following the mentioned updated EU regulation. Unlike most previous studies focused on bottled water, migration assays were here performed by using liquids simulating aqueous and fatty foodstuff, in order to cover as much as possible the different types of food commercially sold in PET containers. We also report Sb levels in apple and wine vinegars for the first time. The selection of these samples was motivated by the fact that acetic acid is known to be an efficient extractant of antimony (Hansen and Pergantis, 2006). Furthermore, inorganic antimony speciation in aqueous food simulants and vinegar after the migration tests was performed by HPLC-ICP-MS and HG-AFS in order to determine the nature of Sb species present and therefore to assess toxicity of the antimony leached from PET.

2. Materials and methods

2.1. Instrumentation

An inductively coupled plasma mass spectrometer (Agilent, HP-7700 Series) fitted with a Meinhard nebulizer and a Peltier cooled sample introduction system was used to measure the total antimony concentration and to quantify antimony content after chromatographic separation.

A continuous flow HG-AFS system (Excalibur P.S. Analytical Ltd.) equipped with a Sb boosted hollow cathode lamp (Super Lamp, Photron, Teknokroma) and a drying membrane (Perma Pure Products, Farmingdale, NJ) was used as an alternative method for total and Sb(III) determination, where Sb(V) was evaluated as the difference between total content and Sb(III).

A PU-2089 HPLC pump (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) fitted with a six-port sample injection valve (Model 7725i, Rheodyne, Rohnert Park, CA, USA) with a 100 µl injection loop was selected for chromatographic experiments. Antimony species separation was based on the use of an anion-exchange column (Hamilton PRP-X100). The chromatographic system was coupled to the ICP-MS by a 5 cm polytetrafluoro-ethylene capillary tube (0.5 mm id) running from the column outlet to the nebuliser inlet for online measurements. The optimum chromatographic and instrumental parameters for ICP-MS and HG-AFS measurements are shown in Table 1.

Table 1

Instrument operating conditions for Sb determination by HG-AFS and HPLC-ICP-MS.

<i>HG-AFS conditions</i>	
Sample flow rate	1.5 ml min ⁻¹
HCl flow rate	1.5 ml min ⁻¹
NaBH ₄ flow rate	1.5 ml min ⁻¹
HCl concentration	2 mol l ⁻¹
NaBH ₄ concentration	1.5%
H ₂ flow rate	540 ml min ⁻¹
Ar flow rate	180 ml min ⁻¹
<i>ICP-MS conditions</i>	
Forward power	1550 W
Plasma gas flow rate	15.0 l min ⁻¹
Auxiliary gas flow rate	1.26 l min ⁻¹
Carrier gas flow rate	1.1 l min ⁻¹
Nebulizer type	Meinhard
Spray chamber type	Scott-double pass
Isotope monitored	¹²¹ Sb, ¹²³ Sb
Internal standard	¹¹⁵ In
<i>LC parameters</i>	
Analytical column	Hamilton PRP X-100 (250 × 4.1 mm)
Mobile phase	5 mM EDTA, 1 mM phthalic acid, pH 3.5
Flow rate	1.5 ml min ⁻¹
Injection volume	100 µl

For total antimony determination, samples were microwave digested in double-walled advanced composite vessels using a 1000 W MSP (Microwave Sample Preparation system) microwave oven (CEM, Matthews, NC, USA).

An incubator Heraeus D-6450 (Hanau, Germany) was used for migration tests.

2.2. Chemicals and reference materials

All chemicals and reagents used were of analytical grade and solutions were prepared with de-ionised water (18 M Ω cm) obtained from a Milli-Q water purification system unit (Millipore, Bedford, MA). 1000 mg/l stock standard solutions of Sb(III) and Sb(V) were prepared by dissolving appropriate amounts of potassium antimonyl tartrate (Sigma–Aldrich, 99% purity) in 6 M HCl and potassium hexahydroxyantimonate (Merk, 99% purity) in 2.4 M HCl, respectively. Antimony stock solutions were stored in glass bottles in the dark at 4 °C and working solutions were prepared daily by dilution.

De-ionised water and glacial acetic acid (Panreac, 99.8%) and EtOH (Scharlau, 99.9%) were used for preparing aqueous food simulants, whereas olive and sunflower oil (from local supermarkets) were employed as fatty food simulants. Samples of apple and wine vinegars were also purchased in local supermarkets.

Total antimony measurements by HG-AFS were based on stibine generation using 1.5% (w/v) NaBH₄ solution (Aldrich, Milwaukee, Wis., USA) in 2 M HCl (Merck, 37%). Boronhydride solution was prepared by dissolving NaBH₄ powder in de-ionised Milli-Q water and stabilising in 0.1% w/v NaOH (Merck). Solutions were filtered before use to eliminate turbidity. Sb(V) was pre-reduced to Sb(III) using 0.5% w/v L-cysteine in 2 M HCl (Sigma–Aldrich, 98.5% purity).

Separation of antimony species for anion-exchange chromatography was performed using 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Merk, 99%) in 1 mM phthalic acid (Aldrich, 99% purity) at pH 3.5 as the mobile phase.

H₂O₂ (35%) from Panreac and HNO₃ (Scharlau, 60%) were used to digest the samples.

A Standard Reference Material for trace elements in natural water (SRM 1640, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD) with a certified antimony content of 13.8 ± 0.42 μ g Sb/kg was used for method validation.

2.3. Specific migration test experiments

Migration tests were carried out according to the above mentioned European regulation. The food simulants used are those listed in Table II of its annex III, in particular: (A) 10% (v/v) ethanol; (B) 3% (w/v) acetic acid; (C) 20% (v/v) ethanol and (D2) vegetable oil. Aqueous food simulants A, B and C are assigned for foods that have a hydrophilic character and are able to extract hydrophilic substances. Food simulant B is used for those foods which have a pH below 4.5, and food simulant C is set for alcoholic foods with an alcohol content of up to 20% and those foods which contain a relevant amount of organic ingredients that render the food more lipophilic. Food simulant D2 is assigned for foods that have a lipophilic character and are able to extract lipophilic substances. Although distilled water has been removed from the aqueous simulants list in the current directive, we decided to include it since bottled water is mainly sold in PET bottles.

According to the directive, the sample shall be placed in contact with the food stimulant, in a manner representing the worst of the foreseeable conditions regarding contact time and temperature. Therefore, double sided, total immersion migration tests were performed as follows: a 12 cm² piece of PET and 20 ml of the studied simulant (area-to-volume ratio 6 dm²/l) were placed in a closed glassy beaker. Samples (plastic + simulant) were then introduced

for 10 days in a thermostatic oven set at 40 °C. Immediately after the test, the total Sb and Sb(III) in the simulants were determined by ICP-MS and HG-AFS. The individual Sb species were measured with HPLC-ICP-MS, following the conditions described above. Three replicates were tested and analysed for each food simulant.

Simulant blanks were also prepared by placing the simulant in the appropriate container without PET and exposed under the test conditions. Specific migration tests were also performed under more severe conditions, applying a temperature of 60 °C for 10 days.

2.4. Reuse migration experiment

The conditions were the same as for specific migration but, in this case, migration tests were carried out three times on a single sample, using another portion of food simulant in each occasion, again following the procedure detailed in regulation EU10/2011. In particular, once the glassy beakers were removed from the oven (after 10 days), the simulant was decanted from the beakers, leaving behind only the PET sample. Each beaker was refilled with 20.0 ml of fresh stimulant and the entire procedure was repeated twice.

2.5. Total antimony determination in liquid food simulants and in PET by ICP-MS and HG-AFS

Aqueous acetic acid (3% w/v) and vinegar were directly analysed without any sample pre-treatment while aqueous ethanol (10% and 20% v/v) was diluted in deionized distilled water prior to analysis. For olive and sunflower oil, 0.5 g were microwave digested with 10.0 ml of nitric acid. About 0.2 g of sample, cut from the PET bottles, was also subjected to microwave digestion. Three replicates were prepared for each sample. The resulting digests were diluted with water up to 100 ml and further analysed by ICP-MS and HG-AFS, following the operating conditions given in Table 1. Antimony quantification was measured by ICP-MS (¹²¹Sb/¹¹⁵In), using indium as the internal standard. Total antimony determination by HG-AFS first requires the reduction of Sb(V) to Sb(III), which was done with 0.5% L-cysteine in 2 M HCl, following the conditions given by Miravet et al. (2004). Then, stibine was generated using 1.5% (w/v) NaBH₄ and 2 M hydrochloric acid. Standard calibration curves of Sb(III) and Sb(V) in the presence of L-cysteine were measured by HG-AFS and no significant differences between the slopes were observed. Sb(V) provides a negligible signal in the absence of L-cysteine while Sb(III) still showed the same intensity compared to the pre-reduced standard. These results show that Sb(V) reduction was complete under the selected conditions. Total antimony was determined by using both the external calibration and standard addition method.

2.6. Speciation of antimony oxidation state in aqueous food simulants and vinegar

Both Sb(III) and Sb(V) species were determined by HPLC-ICP-MS, following the experimental conditions shown in Table 1. Identification and quantification of antimony species was performed by comparing the retention time of standards and by spiking experiments, using both the external calibration and standard addition method.

Sb(III) was also determined by HG-AFS, following the same conditions as for total antimony, but without applying a pre-reduction step with L-cysteine. The concentration of Sb(V) was calculated as the difference between total antimony and Sb(III).

Table 2Migration values for antimony after 10 days of contact at 40 ± 0.5 °C.

Food simulants	ICP-MS (^{121}Sb) ($\mu\text{g Sb l}^{-1}$)	HG-AFS + L-cysteine ($\mu\text{g Sb l}^{-1}$)
Distilled water	0.80 ± 0.08	0.7 ± 0.2
Acetic acid 3%	0.56 ± 0.02	0.6 ± 0.2
EtOH 10%	1.23 ± 0.03	1.3 ± 0.1
EtOH 20%	1.30 ± 0.04	1.2 ± 0.1
Olive Oil	<LOQ	<LOQ
Sunflower Oil	<LOQ	<LOQ

Mean \pm SD. $N = 3$ replicates, confidence interval 95%.

3. Results and discussion

3.1. Quality assurance

Quality assurance steps included blanks, replicate analyses, certified reference material recoveries and calibrations.

Detection (LOD) and quantification limits (LOQ) were determined by analysing, in triplicate, ten solutions of the lowest point of calibration. They were calculated from 3σ and 10σ , respectively, of the signal and then referred to the regression line. Reproducibility was calculated as % RSD from five measurements of two independent standard solutions of 0.5 and 1.0 $\mu\text{g/l}$ of Sb(III), carried on three non-consecutive days. A LOD and LOQ of 0.003 $\mu\text{g/l}$ and 0.010 $\mu\text{g/l}$, respectively, was achieved for ICP-MS. These parameters rose to 0.112 $\mu\text{g/l}$ and 0.375 $\mu\text{g/l}$, respectively, for HG-AFS. These values were considered to be satisfactory since they enabled the determination of Sb at trace levels. Precision was determined in terms of repeatability and reproducibility, which were better than 2% and 8% RSD, for ICP-MS and HG-AFS, respectively.

The certified antimony content in the SRM 1640 material is 13.8 ± 0.42 $\mu\text{g Sb kg}^{-1}$. This standard reference material was analysed by HG-AFS and ICP-MS in triplicate, in order to establish the precision of the measurement. The quantified antimony concentration, matched the certified value considering the associated uncertainties, achieving values of 14.0 ± 0.4 and 13.8 ± 0.8 $\mu\text{g/l}$ for ICP-MS and HG-AFS, respectively.

3.2. Specific migration of antimony into aqueous and fatty-liquid simulants. Antimony content in food packed in PET: vegetable oil and vinegar

The antimony concentration in PET material, measured by ICP-MS and HG-AFS after microwave-assisted digestion, was 269 ± 39 and 276 ± 50 $\mu\text{g Sb/g}$, respectively. These results are in good agreement with those commonly found in the literature; e.g. 168–216 $\mu\text{g Sb/g}$ (Nishioka, Hirahara, & Iwamoto, 2002), 213 $\mu\text{g Sb/g}$ (Westerhoff et al., 2008) and 210–290 $\mu\text{g Sb/g}$ (Keresztes et al., 2009).

The values obtained for Sb migration from PET into aqueous and fatty simulants after ten days of contact, at 40 ± 0.5 °C, are given in Table 2. The Sb concentration values, ranging from 0.56 to 1.23 $\mu\text{g/l}$, were lower than the upper limit set for Sb migration by the EU (5 $\mu\text{g/l}$). However, the values found in ethanol were significantly higher compared to the corresponding migration values with distilled water and acetic acid. This may be explained by the capability of organic solvents to penetrate into plastic packaging materials, causing swelling of the polymer and thus changing its physical structure. As a result, an increase in the diffusivity of the potential migrants is produced, consequently enhancing the migration rate. It is worth noting that no statistically significant differences for Sb migration values from PET into distilled water and into 3% aqueous acetic acid were detected. This was unexpected due to the recognised capability of acetic acid for extracting Sb and stabilizing Sb(III), which could have rendered to an increase in the migration rate.

Table 3

Sb concentration in apple and wine vinegar bottled in PET.

Food	ICP-MS (^{121}Sb) ($\mu\text{g Sb l}^{-1}$)	HG-AFS + L-cysteine ($\mu\text{g Sb l}^{-1}$)	HG-AFS without L-cysteine ($\mu\text{g Sb l}^{-1}$)
Wine vinegar	0.50 ± 0.02	0.5 ± 0.1	<LOD
Apple vinegar	0.45 ± 0.01	0.4 ± 0.2	<LOD

Mean \pm SD. $N = 3$ replicates, confidence interval 95%.

Olive and sunflower oil as fatty-food simulants were also employed in the migration assays. PET bottles are usually considered suitable as containers for vegetable oils, however, very few studies have directly focused on migration from PET into these oils (Fordham, Gramshaw, Crews, & Castle, 1995; Cecchi, Passamonti, & Cecchi, 2009). Consequently, the antimony concentration was determined by ICP-MS after acid MW digestion of vegetable oils, before and after the migration assays. As it can be seen in Table 2, antimony was not detected in any of the vegetable oils, confirming the low tendency of this analyte to migrate into lipophilic compounds.

Extending this study, Sb migration into wine and apple vinegars was also tested. Both products were selected for representing acidified food and for being commercially sold in PET containers. The antimony values found in apple and wine vinegars bottled in PET are presented in Table 3. Sb concentration levels neither exceeded the European-specific migration limit of 40 $\mu\text{g/kg}$ nor the European limit of 5 $\mu\text{g/l}$ for drinking water, being similar to those obtained in the migration assay when using 3% acetic acid as the simulant.

Out of the five simulants employed in the migration assays, the aqueous ones were the most efficient in extracting Sb from PET. However, the results obtained are much lower than the European-specific migration limit of 40 $\mu\text{g/kg}$. In general, antimony exhibited a low tendency to migrate into all the food simulants tested. In additional experiments, migration assays, under extreme conditions (at 60 °C and 10 days storage), were performed. Temperatures up to 60 °C did not produce an increase in antimony leaching from PET (data not shown). It was considered that migration experiments, at higher temperatures were unnecessary, as these conditions are unlikely to be encountered in proper use. However, some authors consider that improper storage conditions, especially during the summertime could lead to higher temperatures. Keresztes et al. (2009) submitted still and sparkling mineral water up to 70 °C during 9 h, and found an increase of Sb concentration from 0.44 to 1.90 $\mu\text{g/l}$. In a different work, Westerhoff et al. (2008) observed that heating at 80 °C for 48 h increased antimony content up to 7 $\mu\text{g/l}$.

Since PET articles could be reused, an experiment to provide information on the migration over several refilling cycles was conducted. This was performed according to the above mentioned rules established by the UE. The data obtained (Table 4) suggested that after an initial peak value, antimony leaching from the polymer migration decreased, except in the case of acetic acid, wherein the antimony content increased from 0.56 ± 0.02 to 6.4 ± 0.9 $\mu\text{g/l}$.

Table 4

Migration values of antimony after re-use migration experiments. Measurements were performed by ICP-MS.

Food simulants	First leaching ($\mu\text{g Sb l}^{-1}$)	Second leaching ($\mu\text{g Sb l}^{-1}$)	Third leaching ^a ($\mu\text{g Sb l}^{-1}$)
Water	0.80 ± 0.08	0.55 ± 0.03	–
Acetic acid 3%	0.56 ± 0.02	6.4 ± 0.9	5.70 ± 0.03
EtOH 10%	1.23 ± 0.03	0.70 ± 0.04	–
EtOH 20%	1.30 ± 0.04	0.8 ± 0.03	–

Mean \pm SD. $N = 3$ replicates, confidence interval 95%.

^a According to the EU directive, only a third assay was performed for acetic acid, the only simulant where the antimony migration level increased in the second test.

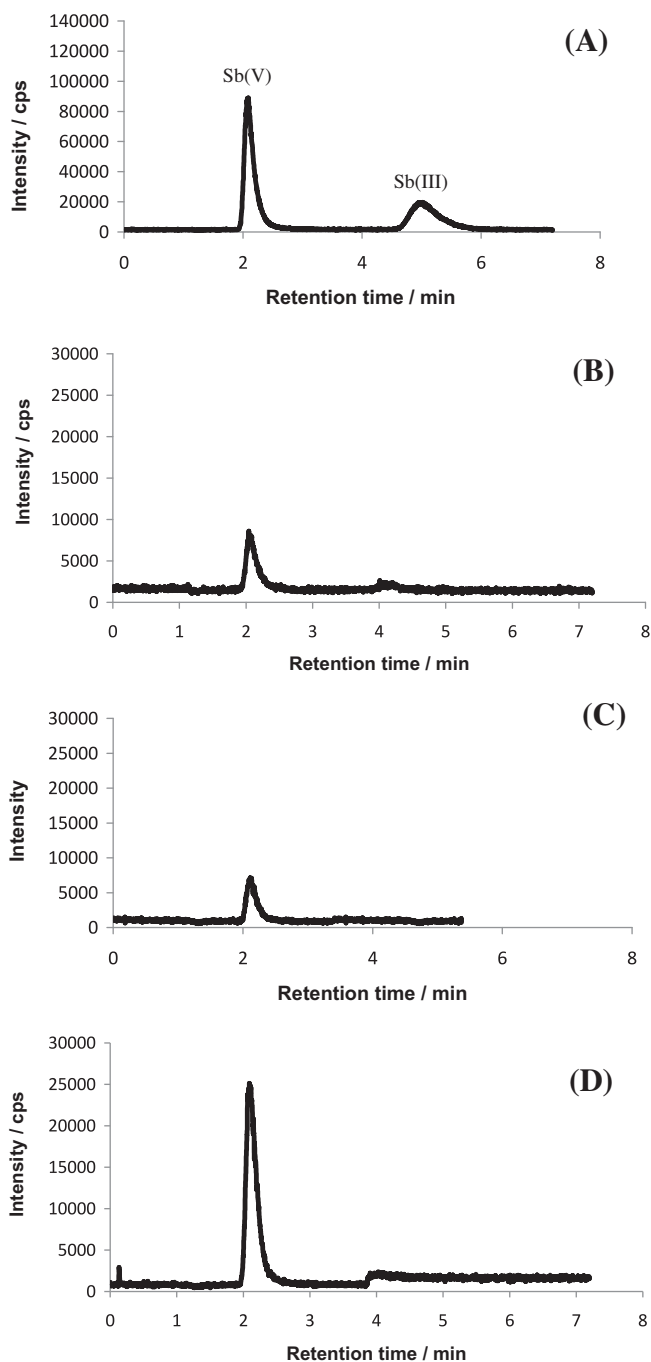


Fig. 1. HPLC-ICP-MS chromatograms achieved with 20 mM EDTA, 2 mM phthalic acid, pH 4.5 as the mobile phase for (A) standards of inorganic antimony species; and Sb leached into aqueous food simulants after 10 days of contact at $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$ such as (B) distilled water, (C) 3% acetic acid, (D) 20% ethanol. Sb-containing peaks identification was carried out by comparison of the retention time with standard solutions and by spiking experiments.

This fact could be attributed to polymer degradation produced by the acid medium of this simulant. This value exceeded the European limit of $5\text{ }\mu\text{g/l}$ for drinking water, however, refilling of PET bottles with acid food is unlikely to happen in real life applications.

3.3. Speciation of antimony oxidation state in aqueous food simulants and vinegar

As previously mentioned, antimony toxicity is strongly dependent on its chemical form and oxidation state, where Sb(III) is more

Table 5

Quantification of Sb(V) by anion-exchange HPLC-ICP-MS in food simulants after migration assays.

Food simulants	Sb found ($\mu\text{g Sb l}^{-1}$)	Sb(V) ($\mu\text{g Sb l}^{-1}$)	R (%)	Sb found ($\mu\text{g Sb l}^{-1}$) HG-AFS without L-cysteine
Water	0.80 ± 0.08	0.73 ± 0.02	93 ± 6	<LOD
Acetic acid 3%	0.56 ± 0.02	0.49 ± 0.04	98 ± 7	<LOD
EtOH 10%	1.23 ± 0.03	1.10 ± 0.02	95 ± 5	<LOD
EtOH 20%	1.30 ± 0.04	1.25 ± 0.03	96 ± 6	<LOD

Mean \pm SD. $N = 3$ replicates, confidence interval 95%.

toxic than Sb(V). Therefore, it is obvious that the determination of Sb species, in food and liquid food stimulants, is a key factor for assessing toxicity.

In order to determine and quantify the inorganic Sb species present in aqueous simulants and vinegar, anion exchange chromatography coupled to ICP-MS was employed for the separation and detection of trivalent and pentavalent antimony, (Fig. 1A). A combination of EDTA and phthalic acid was used as the mobile phase. One disadvantage of using EDTA as the mobile phase, is the conversion of all antimony(III) species into a Sb(III)-EDTA complex, consequently Sb(III) eluted regardless of whether Sb(III)-tartrate, Sb(III)-citrate or SbCl_3 was present in the sample (Hansen, Schmidt, Larsen, Gammelgaard, & Stürup, 2011). However, EDTA does not chelate Sb(V)-complexes or $\text{Sb}(\text{OH})_6^-$. The HPLC-ICP-MS chromatograms of Sb species leached into aqueous food simulant solutions (Fig. 1B–D), only show one antimony-containing peak. Based on the retention time ($t_r = 2\text{ min}$), spiking experiments and the above mentioned considerations, the chromatographic peak was attributed to the presence of antimonate ($\text{Sb}(\text{OH})_6^-$).

A further quantification of the Sb-containing peak in all aqueous food stimulants, provided recovery values around 100% with

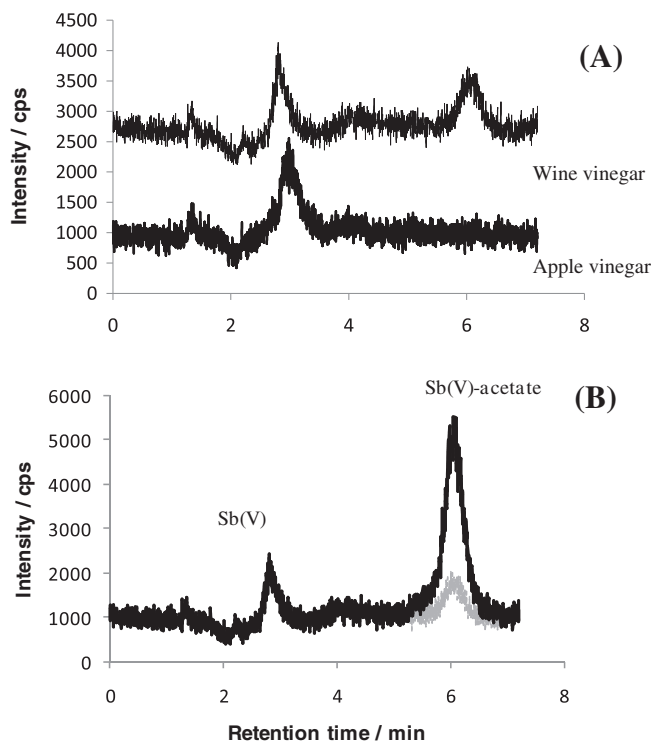


Fig. 2. HPLC-ICP-MS chromatograms achieved with 20 mM EDTA, 2 mM phthalic acid, pH 4.5 as the mobile phase for antimony redox speciation in (A) apple and wine vinegars and (B) in spiked (black line) and non spiked (gray line) wine vinegar.

respect to the antimony leached into each simulant (Table 5). These results were also verified by HG-AFS. Stibine generation without the addition of L-cysteine in each liquid simulant and detection by AFS does not provide any analytical signal, suggesting that the leached antimony is likely to be Sb(V).

With regard to the antimony species in vinegar samples (Fig. 2), both apple and wine vinegars showed a Sb-containing peak at 2.8 min, which matched with the retention time of the $\text{Sb}(\text{OH})_6^-$ standard. Furthermore, wine vinegar also presented a Sb-containing peak at 6.1 min. Because of the high content of acetic acid (6%) in wine vinegar, this peak might be attributed to Sb(V)–acetate. Following the procedure detailed by Hansen et al. (2011), a solution of Sb(III) or Sb(V) prepared in 6% acetic acid was added to the wine vinegar sample and injected into the applied chromatography technique. As expected, the Sb(III)–acetate complex peak matched the retention time of Sb(III)–EDTA (4 min), due to the conversion of Sb(III)–acetate into the EDTA complex within the column (data not shown). However, Sb(V)–acetate had a similar retention time to the peak appearing at 6 min (Fig. 2B).

Quantification of Sb in both vinegars by HG-AFS in the absence of L-cystine (Table 3), also showed only a negligible antimony signal, confirming that antimony is present mostly as Sb(V). It is interesting to note, that a peak associated to Sb(V)–acetate was not detected, neither in 3% acetic acid after the migration test, nor in apple vinegar. The reason for that might be the low concentration of acetic acid present in these matrices (3% acetic acid w/v).

Antimony is added to PET during its manufacture as Sb_2O_3 , and consequently Sb(III) is expected to be present in the samples. However, in the current study all antimony leached into the samples was in the Sb(V) form. The results reported in the literature are, at this point, somehow contradictory, Takahashi, Sakuma, Zheng, and Mitsunobu (2008) found large differences between different bottles, and in some bottles only Sb(III) was present, whereas the Sb(V) fraction reached 50% in others. In a study on leaching of Sb from PET bottles into citrus fruit juices, it could be shown that both a Sb(V)–citrate complex and inorganic Sb(III) were present. The high concentration of the trivalent oxidation state (44% of total Sb) in juices was attributed to its stabilization by complexation with citric acid, which preserves the oxidation state of the leached Sb(III) (normally prone to oxidation) (Hansen and Pergantis, 2006). Possible explanations for discrepancies in results might be related to the nature of the PET material, the type of food under study and the experimental set-up selected. Therefore, it remains unclear whether the presence of Sb(V) is due to partial or complete oxidation of Sb_2O_3 during the PET polycondensation reaction (where this element acts as a catalyst), during storage or during performance of the migration assays.

In conclusion, the results obtained in this work show that specific migration values for antimony, into standardised aqueous and fatty food stimulants, are much lower than the upper limit set by the EU (40 µg/kg) and in all cases below the European limit of 5 µg/l for drinking water. These results prove the low tendency of Sb to migrate from PET into food under normal conditions of use. Antimony oxidation state speciation studies show that Sb leached in the simulants was mainly in the Sb(V) form. Therefore, the often addressed question regarding toxic effects caused by antimony from PET bottles, appears to be groundless. Consequently, PET packaging can be considered safe concerning antimony migration for all types of food simulants. While previously reported information on Sb migration is mostly derived from antimony leached into drinking water under a broad variety of experimental conditions (some of them very difficult to find in real use), the current study was based on performing a migration assay according to

the current European Union directive, which enables us to compare and harmonise results, and to establish the real hazard caused by antimony leached from PET bottles. The obtained results were validated using two independent methodologies based on ICP-MS and HG-AFS, both with satisfying analytical characteristics and detection limits in the sub µg/kg range, as well as the application of the proposed method to a matrix matched Certified Reference Material.

Acknowledgements

The Research Group for Trace and Speciation Analysis of the Complutense University thank the Spanish Commission of Science and Technology (CTQ2011-22732), the Community of Madrid (Spain) and European Community for funding in the frame of the FEDER programme (project S2010/AGR-1464, ANALYSIC II). María Sánchez-Martínez would also like to thank the Spanish Government for a doctoral fellowship (CTQ2008-05925).

References

- Bach, C., Dauchy, X., Chagnon, M. C., & Etienne, S. (2012). Chemical compounds and toxicological assessments of drinking water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: A source of controversy reviewed. *Water Research*, 46, 571–583.
- Cecchi, T., Passamonti, P., & Cecchi, P. (2009). Is it advisable to store olive oil in PET bottles? *Food Reviews International*, 25, 271–283.
- Commission of the European Communities (2003). Official Journal of the European Union. Directive 2003/40/EC.
- Duh, B. (2002). Effect of antimony catalyst on solid-state polycondensation of poly(ethylene terephthalate). *Polymer*, 43, 3147–3154.
- Environmental Protection Agency (2009). National Primary Drinking Water Regulations: Drinking Water Regulations for Aircraft Public Water Systems.
- Filella, M., Belzile, N., & Lett, M. C. (2007). Antimony in the environment: A review focused on natural waters. III. Microbiota relevant interactions. *Earth-Science Reviews*, 80, 195–217.
- Fordham, P. J., Gramshaw, J. W., Crews, H. M., & Castle, L. (1995). Element residues in food contact plastics and their migration into food simulants, measured by inductively-coupled plasma-mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*, 12, 651–669.
- Hansen, H. R., & Pergantis, S. A. (2006). Detection of antimony species in citrus juices and drinking water stored in PET containers. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21, 731–733.
- Hansen, H. R., & Pergantis, S. A. (2008). Analytical techniques and methods used for antimony speciation analysis in biological matrices. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23, 1328–1340.
- Hansen, C., Schmidt, B., Larsen, E. H., Gammelgaard, B., & Stürup, S. (2011). Quantitative HPLC-ICP-MS analysis of antimony redox speciation in complex sample matrices: New insights into the Sb-chemistry causing poor chromatographic recoveries. *Analyst*, 136, 996–1002.
- Hansen, C., Tsigotaki, A., Bak, S. A., Pergantis, S. A., Stürup, S., Gammelgaard, B., et al. (2010). Elevated antimony concentrations in commercial juices. *Journal of Environmental Monitoring*, 12, 822–824.
- Keresztes, S., Tatár, E., Mihucz, V. G., Virág, I., Majdik, C., & Zárny, G. (2009). Leaching of antimony from polyethylene terephthalate (PET) bottles into mineral water. *Science of the Total Environment*, 407, 4731–4735.
- Miravet, R., López-Sánchez, J. F., & Rubio, R. (2004). Comparison of pre-reducing agents for antimony determination by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 511, 295–302.
- Nishioka, K., Hirahara, A., & Iwamoto, E. (2002). Determination of antimony in polyethylene terephthalate bottles by graphite furnace atomic absorption spectrometry using microwave sample preparation. *Bulletin of Faculty of Human Life and Environmental Science*, 8, 35–42.
- Pang, K., Kotek, R., & Tonelli, A. (2006). Review of conventional and novel polymerization processes for polyesters. *Progress in Polymer Science*, 31, 1009–1037.
- Reimann, C., Birke, M., & Filzmoser, P. (2010). Bottled drinking water: Water contamination from bottle materials (glass, hard PET, soft PET), the influence of colour and acidification. *Applied Geochemistry*, 25, 1030–1046.
- Saracoglu, S., Soylak, M., Dogan, M., & Elci, L. (2003). Speciation of antimony using chromosorb 102 resin as a retention medium. *Analytical Sciences*, 19, 259–264.
- Shotyk, W., Krachler, M., & Chen, B. (2006). Contamination of Canadian and European bottled waters with antimony from PET containers. *Journal of Environmental Monitoring*, 8, 288–292.
- Smichowski, P., Madrid, Y., & Cámara, C. (1998). Analytical methods for antimony speciation in waters at trace and ultratrace levels. A review. *Journal of Analytical Chemistry*, 360, 623–629.

- Takahashi, Y., Sakuma, K., Zheng, G., & Mitsunobu, S. (2008). Speciation of antimony in PET bottles produced in Japan and China by X-ray absorption fine structure spectroscopy. *Environmental Science & Technology*, 42, 9045–9050.
- Welle, F., & Franz, R. (2011). Migration of antimony from PET bottles into beverages: Determination of the activation energy of diffusion and migration modeling compared with literature data. *Food Additives and Contaminants*, 28, 115–126.
- Westerhoff, P., Prapaipong, P., Shock, E., & Hillareau, A. (2008). Antimony leaching from polyethylene terephthalate (PET) plastic used for bottled drinking water. *Water Research*, 42, 551–556.
- World Health Organization (2003). Guidelines for Drinking-water Quality.

IX.GLOSARIO DE TÉRMINOS

IX. GLOSARIO DE TÉRMINOS

AA: absorción atómica

ABG: ascorbígeno

AFS: espectroscopia de fluorescencia atómica

AESAN: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición

CAM: carbamidometilación

CE: electroforesis capilar

CIBM: Centro de Investigaciones Biomédicas

CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Cys: cisteína

DMSe: dimetilseleniuro

DMDSe: dimetildiselenio

DMSaS: dimetilseleniosulfuro

DTT: ditiotreitól

ESI-MS: espectrometría de masas de ionización por electrospray

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

FOSHU: alimentos para uso específico de la salud

GC: cromatografía de gases

GPx: glutatión peroxidasa

GSH: glutatión reducido

GSSG: glutatión oxidado

HFBA: ácido heptafluorobutírico

HG-AFS: espectroscopia de fluorescencia atómica con generación de hidruros

HPLC: cromatografía de líquidos de alta eficacia

I3ACN: indol-3-acetonitrilo

I3C: indol-3-carbinol

IAM: yodoacetamida

ICP-MS: plasma de acoplamiento inductivo con espectrometría de masas

ICP-OES: plasma de acoplamiento inductivo con detección óptica

ICTAN: Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición

ID: yodotironina deydinasa

IDA: análisis por dilución isotópica

IE: intercambio iónico

INMS: Instituto de Patrones Nacionales para la Medición

INTA: Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos

ITC: tioisocianatos

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

LC: cromatografía de líquidos

MALDI-TOF: espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización láser asistida por matriz

Met: metionina

MS: espectrometría de masas

MSA: ácido metilselenínico

NPC: Prevención Nutricional contral el Cáncer

NRCC: Consejo Nacional de Investigación de Canadá

ORAC: capacidad de absorción de radicales oxígeno

PET: polietileno de tereftalato

PLE: extracción con líquidos presurizados

RDA: cantidad diaria recomendada

ROS: especies reactivas de oxígeno

RP: fase inversa

SEC: cromatografía de exclusión molecular

SCF: Comité Científico de los Alimentos

SeCys: selenocisteína

SeCys₂: selenocistina

SELECT: ensayo sobre la influencia del selenio y la vitamina E en la prevención del cáncer de próstata

SELENIB: ensayo sobre la influencia del selenio y la vitamina E en la prevención del cáncer de vejiga

SeMeSeCys: selenometilselenocisteína

SeMet: selenometionina

SeIP: selenoproteína P

T3: triyodotironina

T4: tiroxina

TFA: ácido trifluoroacético

TIMS: espectrometría de masas con fuente de ionización térmica

TMSe: trimetilselenonio

TR: tiorredoxina reductasa

Tris: tris-(hidroximetil)-aminometano

UE: Unión Europea

USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

USP: sonda de ultrasonidos

γ -glutamil-SeMeSeCys: gamma-glutamil selenometilselenocisteína

YEPD: extracto de levadura de peptona y dextrosa

